DARSTELLUNG HYDROPHILER POLYACRYLAMIDGELE, IHRE EIGENSCHAFTEN UND VERWENDUNG IN DER GELCHROMATOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim
Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

CECILIA BILBAO
aus Concepción (Chile)

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

DARSTELLUNG HYDROPHILER POLYACRYLAMIDGELE, IHRE EIGENSCHAFTEN UND VERWENDUNG IN DER GELCHROMATOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim
Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

CECILIA BILBAO

aus Concepción (Chile)

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am	29.6.1979
Tag der mündlichen Prüfung	13.7.1979
Berichterstatter:	Prof.Dr. W. Heitz
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. W. Ruland

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Theorie der Gelchromatographie	4
3.	Technik der Perlpolymerisation	7
4.	Darstellung vernetzter Perlcopolymerer des Acrylamids	8
4.1	Aufarbeitung der in Gegenwart von Wasser hergestellten Perlcopolymeren	9
4.2	Aufarbeitung der heterogen-vernetzten Perlcopolymeren	9
5.	Eigenschaften der in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgele	11
5.1	Quellungsversuche	12
5.2	Trenneigenschaften	15
6.	Heterogen-vernetzende Copolymerisation	22
7.	Einfluß der Versuchsbedingungen auf die Eigenschaften der heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele	25
7.1	Die Zusammensetzung der Inertkomponente	25
7.2	Die Vernetzungskomponente	37
7.3	Die Konzentration der Vernetzungskomponente	41
7.4	Der Initiator	45
7.5	Das Schutzkolloid	46
8.	Gelchromatographische Trennung von Proteinen an Polyacrylamidgelen	48
9.	Mechanische Stabilität der Polyacrylamidgele	54

Seite

10. Experimenteller Teil 58

10.1 Reinigung der Reagenzien 58

10.2 Darstellung der Perlcopolymerisate 58

10.2.1 Beschreibung der Apparatur 58

10.2.2 Durchführung der Perlcopolymerisationen 60

10.3 Darstellung von N,N´-Ethylenbisacrylamid 60

10.4 Modifizierung des Schutzkolloids durch polymeranaloge Umsetzung 63

10.5 Versuchsanordnung für die gelchromatographischen Trennungen 67

11. Zusammenfassung 75

12. Literaturverzeichnis 77

1. Einleitung und Problemstellung

Die Gelchromatographie hat sich zu einer wertvollen Methode für die Trennung von Substanzmischungen nach Molekulargewichtsunterschieden entwickelt. Heute wird diese Methode hauptsächlich zur Charakterisierung von Polymeren eingesetzt, da die Molekulargewichtsverteilung eine der wichtigsten Eigenschaften eines Polymeren ist und eine ganze Reihe von makroskopischen Eigenschaften damit verknüpft sind. Porath und Flodin [1] entwickelten 1959 ein Gel auf der Basis von mit Epichlorhydrin vernetzten Dextranen, das als stationäre Phase für die Trennung wasserlöslicher Stoffe anwendbar ist. Dieses Gel wird industriell hergestellt und unter dem Handelsnamen "Sephadex" vertrieben. Inzwischen wurden noch andere hydrophile Gele hergestellt, wie z.B. die auf der Basis von Agarose [2] und Polyacrylamid [3].

Diese Trennmaterialien haben eine erhebliche Bedeutung auf dem Gebiet der Biochemie, da sie für die Proteincharakterisierung [4] (Entsalzung, Gruppentrennung, Molekulargewichtsbestimmung) besonders geeignet sind.

Gele, die zur Trennung hydrophober Substanzen erfolgreich eingesetzt werden, wurden erst in neuerer Zeit entwickelt. Determann [5] berichtete 1964 über Auftrennungen von Oligostyrolen an vernetzten Polymethylmethacrylatgelen (Copolymerisate von Methylmethacrylat mit Ethylenglykoldimethacrylat).

Moore [6] entwickelte 1964 vernetzte Polystyrolgele unter Verwendung von Verdünnungsmitteln, die hervorragende Eignung zur Gelchromatographie von synthetischen Makromolekülen in organischen Lösungsmitteln aufzeigten (Molekulargewichtsbereich 10^2 bis 10^{10}). Solche Gele sind unter dem Namen "Styragel" im Handel.

Heitz [7] stellte ein mit Divinyladipat vernetztes Polyvinylacetatgel her, das ebenfalls Trennungen von Polymeren in organischen Lösungsmitteln erlaubt. Copolymere, die als stationäre Phase in der Gelchromatographie verwendet werden, sollen aus kugelförmigen Teilchen bestehen, um günstige Säulenpackungen und damit hohe Trennleistungen zu erzielen. Deshalb werden die Gele im allgemeinen durch Perlpolymerisation hergestellt. Führt man eine Perlpolymerisation durch, bei der die Monomerphase ausschließlich aus Monovinylverbindung, Divinylverbindung und

Initiator besteht, so erhält man ein Polymerisationsprodukt, das definitionsgemäß als homogen-vernetzt bezeichnet werden soll [7].

Die Porengröße und damit das Ausschlußmolekulargewicht*) dieser Gele läßt sich durch die Menge des Vernetzers in weiten Grenzen variieren. Die Copolymeren besitzen im ungequollenen Zustand keine Porosität, sondern erst nach Quellung in einem geeigneten Lösungsmittel. Man spricht hierbei von Quellungsporosität.

Mit sinkendem Vernetzergehalt wird das Ausschlußmolekulargewicht größer, aber die Gele werden im gequollenen Zustand relativ weich. Eine obere Grenze für die Anwendung dieser Methode ist dann erreicht, wenn die Quellbarkeit infolge der Verringerung des Vernetzergehaltes so groß ist, daß die Säule durch die Deformation der Gelteilchen verstopft.
Homogen-vernetzte Gele zeigen günstige Ergebnisse bei der Trennung von Oligomeren, wenn die Vernetzermenge etwa zwischen 1 und 5 Mol-% der Monomermischung gewählt wird [8]. Oligomere bis zu einem Molekulargewicht von 5000 können mit diesen Gelen getrennt werden.

Heterogen-vernetzte Copolymere[7] entstehen, wenn die Copolymerisation eines Monomeren mit hohem Vernetzeranteil in Gegenwart einer Inertkomponente durchgeführt wird [6]. Es tritt während der Perlpolymerisation in jedem polymerisierenden Tropfen eine Phasentrennung ein. Die Inhomogenität wächst mit sinkendem Solvatationsvermögen der Inertkomponente und mit zunehmendem Vernetzergehalt. So hergestellte Polymerisate weisen eine heterogene Netzwerkstruktur auf und zeigen häufig im ungequollenen Zustand Porosität (permanente Porosität). Diese Gele können für die Trennung hochmolekularer Polymere bis zu Molekulargewichten von 10^{10} eingesetzt werden.

Diese Arbeit befaßt sich mit der Herstellung hydrophiler Acrylamidgele, die zur Trennung von hochmolekularen, wasserlöslichen Polymeren nach ihrer Molekülgröße geeignet sein sollen. Die herzustellenden Gele sollen vor allem Anwendung auf dem Gebiet der Proteintrennung finden, da ein großer Bedarf zur Molekulargewichtsbestimmung dieser häufig empfindlichen und in großer Vielzahl in der Natur

*) Entspricht etwa dem Molekulargewicht der Teilchen, die gerade nicht mehr in Poren des Gels eindringen können (zur Def. vgl. Abb.1).

vorkommenden Makromoleküle besteht.

Über die Anwendung vernetzter Polyacrylamidgele zur Trennung von Proteinen wurde schon 1962 berichtet [3,9,10]. Polyacrylamidgele entstehen, indem man Acrylamid in Gegenwart eines bifunktionellen Acrylamids (z.B. N,N´-Methylenbisacrylamid) polymerisiert. Hjerten [10] hat Polyacrylamidgele hergestellt, wobei er durch Variation der Gesamtkonzentration an Monomeren (bei konstantem Vernetzergehalt) eine Reihe von Gelen mit abgestufter Quellfähigkeit erhielt. Sun und Sehon [11] haben ähnliche Polyacrylamidgele erzeugt. Diese Autoren haben neben der Gesamtkonzentration auch die relative Vernetzerkonzentration variiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten Polyacrylamidgele hergestellt werden, die einige Vorteile zu den jetzigen im Handel vorhandenen hydrophilen Gelen (z.B. Sephadex, Bio-Gel etc.) haben. Zu den gewünschten Eigenschaften gehören:

a) Ein hohes Ausschlußmolekulargewicht

b) Biostabilität (sie sollen keinem Befall durch Mikroorganismen unterliegen)

c) Druckstabilität

d) Abwesenheit von Adsorptionserscheinungen gegenüber dem zu trennenden Substanzgemisch

e) Keine oder geringe Änderung der Quellung in verschiedenen Elektrolyten.

2. Theorie der Gelchromatographie

Bei den chromatographischen Verfahren erfolgt die Auftrennung von Stoffgemischen durch die Verteilung der Substanzen zwischen der mobilen Phase und dem zugänglichen Porenanteil der stationären Phase.

Die stationäre Phase besteht aus einem porösen Material, dessen Porengröße mit der Molekülgröße der zu trennenden Moleküle übereinstimmt. Großen Molekülen stehen auf Grund der Porengrößenverteilung keine Poren, in die sie eindringen können, zur Verfügung. Mit abnehmender Größe können die Moleküle immer mehr Poren nutzen. Die kleinsten Moleküle zeigen also die größte Verweildauer in der Säule.

Die erste Substanz verläßt die Säule, wenn ein Volumen V_0 ausgeflossen ist, das gleich dem Volumen zwischen den Gelkörnern ist. V_0 ist das Ausschlußvolumen. Kleinere Moleküle werden in einem größeren Volumen eluiert. Die kleinsten Moleküle, die in alle Poren einzudringen vermögen, werden die Säule verlassen, wenn nach dem Ausschlußvolumen V_0 noch ein zusätzliches Volumen V_I geflossen ist, das gleich dem Volumen des Lösungsmittels in den Gelkörnern ist. Eine Trennung und umgekehrt eine Molekulargewichtsbestimmung ist nur innerhalb des Volumenbereiches V_0 und $V_0 + V_I$ möglich. Schematisch zeigt dies die Abbildung 1.

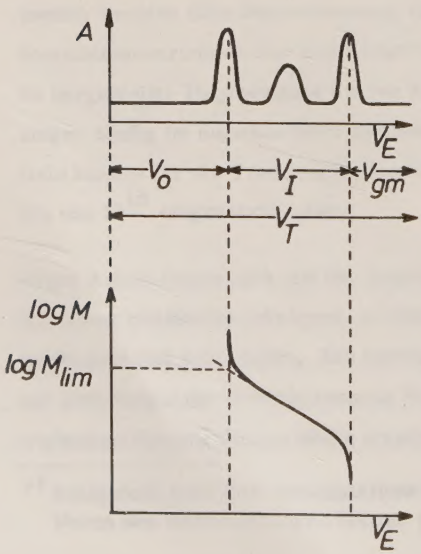


Abb.1:

Elutionsverhalten bei gelchromatographischen Versuchen.

A = Schreiberausschlag
V_E = Elutionsvolumen
V_0 = Ausschlußvolumen
V_I = Innenvolumen
V_{gm} = Volumen der Gelmatrix
V_T = Gesamtsäulenvolumen
M_{lim} = Ausschlußmolekulargewicht

Innerhalb der vorgegebenen Grenzen von V_0 und $V_0 + V_I$ besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen V_E. Durch Extrapolation des linearen Teils der Kurve bis zum Wert V_0 wird das Ausschlußmolekulargewicht M_{lim} festgelegt. Das Ausschlußmolekulargewicht M_{lim} ist für die stationäre Phase ein charakteristischer Wert.

Die Wechselwirkung zwischen der gelösten Substanz und der Gelphase ist nicht identisch mit den Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und der Substanz. Dies führt zu einer substanzspezifischen Verteilung mit einem Verteilungskoeffizienten K zwischen dem Außenvolumen V_0 und dem Teil α des Porenvolumens V_I, das der Substanz, bedingt durch die Molekülgröße, zugänglich ist. Für das Elutionsvolumen gilt

$$V_E = V_0 + \alpha K V_I \quad . \qquad (1)$$

K ist bei üblichen gelchromatographischen Versuchsbedingungen 1 oder nahezu 1. Bedingt durch die Abweichung von 1 kann $V_E > V_0 + V_I$ werden. Die Gelchromatographie wird als eine netzwerklimitierte Verteilung aufgefaßt [12].

Die Trenngüte einer Säule wird durch die Anzahl der äquivalenten Verteilungsschritte n (theoretische Bodenzahl) gekennzeichnet. Die Peakform entspricht einer Gauß-Funktion. Aus der Peakbreite einer niedermolekularen Substanz kann die Trennstufenzahl n nach Gleichung (2) berechnet werden:

$$n = \left(\frac{V_E}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{V_E}{b}\right)^2 \quad , \qquad (2)$$

wobei σ die Standardabweichung des Elutionspeaks in ml und b die Basisbreite des Peaks ebenfalls in ml ist. b entspricht dem von beiden Wendepunktstangenten erzeugten Basisabschnitt. Aus der Trennstufenzahl erhält man die theoretische Bodenhöhe H nach Gleichung (3).

$$H = \frac{L}{n} \quad , \qquad (3)$$

wobei L die Säulenlänge ist.

Eine Verbreiterung der Banden (Erhöhung von H) kann durch verschiedene Faktoren zustandekommen, u.a. durch unvollständige Einstellung des Diffusionsgleichgewichts und durch extrem langsame oder extrem schnelle Strömungsgeschwindigkeit. Weiterhin steigt H stark an, wenn die Säule nicht gleichmäßig gepackt ist

oder andere technische Fehler in der Versuchsanordnung vorliegen.

Eine neuere Übersichtsarbeit über die Gelchromatographie und ähnliche Techniken wurde von Heitz [13] herausgegeben.

3. Technik der Perlpolymerisation

Da die Acrylamidcopolymerisate für chromatographische Zwecke Verwendung finden sollen, ist es vorteilhaft, sie in Perlform zu erzeugen. Säulenpackungen aus kugelförmigen Teilchen besitzen einen geringen Strömungswiderstand und erlauben hohe Durchflußgeschwindigkeiten. Zur Herstellung solcher kugelförmiger Teilchen bedient man sich der Perlpolymerisation (bzw. Perlcopolymerisation).

Bei der Perlcopolymerisation wird eine Monomermischung in einem Medium, in welchem sie sich nicht löst (meist Wasser), durch Rühren dispergiert. Monomerlösliche Initiatoren starten die Polymerisation in den Monomertröpfchen. Innerhalb dieser Tröpfchen herrschen die Bedingungen der Substanzpolymerisation. Durch Zusatz eines Schutzkolloids zur äußeren Phase kann das Zusammenlaufen der Tröpfchen verhindert werden. Ab ca. 20 % Umsatz nimmt die Tendenz der Agglomeratbildung zu, weil die Tröpfchen hochviskos sind.

Als wasserlösliche Schutzkolloide verwendet man: Agar-Agar, Pektine, Leim, Gelatine, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polymethylvinyläther etc. . Bei Verwendung dieser wasserlöslichen Schutzkolloide bildet sich während der Polymerisation in der wäßrigen Phase eine sehr feine Emulsion. Es wurde festgestellt, daß diese Emulsion die einzige Ursache dafür ist, daß die Ausbeute an Perlen zum Teil weit unter 100 % bleibt[14].

Die Größe der erhaltenen Perlen hängt von den Versuchsbedingungen ab[15], besonders von der Rührgeschwindigkeit, der Viskosität der beiden Phasen und der Art und Konzentration des Schutzkolloids. Bei gleicher Gefäß- und Rührerform hat die Rührgeschwindigkeit den stärksten Einfluß auf die Perlgröße. Der Teilchendurchmesser nimmt mit wachsender Umdrehungszahl des Rührers ab. Hopff und Mitarb.[15] haben gezeigt, daß die Größe der Perlen kurze Zeit nach Versuchsbeginn engültig festgelegt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gele auf der Basis von wasserlöslichen Monomeren hergestellt. Aus diesem Grunde mußte man die Perlcopolymerisation in inverser Phase durchführen, d.h. die Monomeren und der Initiator wurden in Wasser gelöst und in einer organischen Phase, die das Schutzkolloid löst, fein verteilt.

4. Darstellung vernetzter Perlcopolymere des Acrylamids

Zur Herstellung der Gele dienten als Monomere Acrylamid und analog aufgebaute Divinylverbindungen, die alle wasserlösliche Festsubstanzen sind. Deshalb war es notwendig, die Monomerkomponenten in einem Lösungsmittel zu polymerisieren, d.h. es wurden Polyacrylamidgele erzeugt, die von der bei Substanzpolymerisation optimalen Verteilung der Netzwerkdichte abweichen. Das hierfür eingesetzte Wasser ist aber ein sehr gutes Lösungsmittel für das Polyacrylamid und die Makromoleküle werden dadurch stark solvatisiert. Das entstehende Polymere besitzt in einigen Fällen eine Netzwerkstruktur, die näherungsweise der eines homogen-vernetzten Gels entspricht; bei stärkerer Verdünnung können aber bereits Gele erzeugt werden, die eine gewisse Heterogenität zeigen. Durch Zumischen von schlechten Lösungsmitteln wird die Heterogenität jedoch wesentlich erhöht, daher werden in dieser Arbeit Gele, die nur in Gegenwart von Wasser hergestellt wurden, getrennt behandelt.

Die Perlcopolymerisationen wurden in einem 1-Liter Flanschkolben mit Vierhals-Flanschdeckel und Metallrührer durchgeführt (siehe Abb.25, Kap. 10.2.1). Der verwendete Rührmotor gestattete die Einhaltung einer konstanten Rührgeschwindigkeit, die je nach Versuchsbedingungen zwischen 350 und 500 U/min betrug. Als Schutzkolloid wurde bei allen Polymerisationen ein Copolymeres aus Maleinsäureanhydrid und Octadecen *) eingesetzt. Als äußere Phase diente Leichtbenzin (Siedebereich 100-140^{o}C). Das Verhältnis der wäßrigen zur organischen Phase wurde in den Grenzen 1:2 bis 1:1 variiert. Die wäßrige Phase bestand bei den in Kapitel 5 beschriebenen Copolymerisationen aus Initiator (Ammoniumperoxodisulfat, Konzentration: 0,8 Gew.-% der Monomeren), Acrylamid, Vernetzer und Natronlauge, die für die partielle Hydrolyse des Schutzkolloids eingesetzt wurde. Bei den heterogen-vernetzenden Copolymerisationen wurde zusätzlich ein organisches Verdünnungsmittel zu der Monomerphase gegeben. Die Temperatur wurde nach einer Polymerisationszeit von 2 h bei 40^{o}C auf 50^{o}C und nach 1 h auf 60^{o}C erhöht. Anschließend wurde 1 h bei dieser Temperatur weiter polymerisiert.

---

*) Unter dem Namen "PA-18" im Handel. Hersteller: Gulf Oil Chemicals Comp., Houston, Texas 77001 (USA).

Bei den in Gegenwart von Wasser durchgeführten Perlcopolymerisationen schwanken die Ausbeuten zwischen 85 und 90 % , bei den heterogen-vernetzten Perlcopolymerisationen zwischen 80 und 95 % des eingesetzten Monomergemisches.

4.1 Aufarbeitung der in Gegenwart von Wasser hergestellten Perlcopolymeren

Nach beendeter Polymerisation wird der Kolbeninhalt in einen Überschuß Aceton gegossen. Das Polymerisat setzt sich langsam ab. Nach einigen Stunden wird die darüberstehende trübe Flüssigkeit vom Bodensatz dekantiert. Das Polymerisat wird erneut mit frischem Aceton kräftig gerührt. Diesen Vorgang wiederholt man solange, bis das Aceton über dem Bodensatz klar bleibt. Durch diese Behandlung werden Leichtbenzin und der größte Teil der feinen Partikel entfernt.

Durch Waschen mit Wasser wird das Aceton entfernt und anschließend das Gel in nassem Zustand (teilweise in Methanol) nach der Korngröße fraktioniert. Polymerpartikel mit einem Durchmesser kleiner als 0,03 mm verlangsamen die Strömungsgeschwindigkeit der Säule zu stark und mit Partikeln, deren Durchmesser größer als 0,1 mm ist, erzielt man keine gute Trennleistung mehr. Je enger die Korngrößenverteilung der Perlen ist, umso besser wird die Packungsdichte und damit die Trennleistung [16]. Zur Fraktionierung, die jeweils 15 h dauerte, wurde ein sehr langsam laufendes Trommelsieb verwendet. Im Normalfall wurde eine Fraktion zwischen 0,04 und 0,1 mm ausgesiebt.

Nach anschließendem Waschen mit Aceton wird das gesiebte Copolymerisat abgenutscht und im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2 Aufarbeitung der heterogen-vernetzten Perlcopolymeren

Die Aufarbeitung von Polymerisaten, die in Gegenwart eines organischen Verdünnungsmittels polymerisiert wurden, verläuft analog der in Abschnitt 4.1 gegebenen Vorschrift. Durch Waschen mit Aceton und anschließend mit Wasser werden das Leichtbenzin und die Inertkomponente aus den Gelen entfernt. Mit zunehmender Menge an Verdünnungsmittel in der Monomerphase erhält man klebrige

Perlen, die zusammenklumpen. Dadurch wird das Sieben und Trocknen erschwert. Um dennoch einzelne Perlen zu erhalten, kann man die Agglomerate mit einem schnell laufenden Rührer zerschlagen. Nach ca. 30 minütigem Rühren des in Wasser gequollenen Gels erhält man größtenteils einzelne Perlen. Man entfernt die noch verbliebenen Konglomerate durch ein grobes Sieb. Will man die Gele unmittelbar zur gelchromatographischen Trennung verwenden, kann auf das Trocknen verzichtet werden. Wenn eine Fraktionierung durch Sieben nicht möglich war, wurden aus den Gelen durch mehrmaliges Sedimentieren und Dekantieren alle feinen Anteile entfernt und anschließend mit diesen Gelen die Säule gefüllt.

5. Eigenschaften der in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgele

Zur Herstellung von Perlpolymerisaten auf Acrylamidbasis, die auf Grund der ausschließlichen Verwendung von Wasser - wie bereits erwähnt - homogen-vernetzten Gelen ähnlich sind, wurde immer N,N´-Methylenbisacrylamid als Vernetzungsmittel eingesetzt.

Bei homogen-vernetzten Gelen wird das Ausschlußmolekulargewicht allgemein mit sinkendem Vernetzergehalt größer, dabei nimmt aber die Druckstabilität der Gele ab. Fawcett und Morris [17] haben darauf hingewiesen, daß Polyacrylamidgele, hergestellt in wäßrigen Lösungen mit Monomergehalten zwischen 6,5 und 8 % und hohen Vernetzerkonzentrationen (zwischen 15 und 25 % bezogen auf die Monomeren) eine erheblich größere Porosität als die vergleichbaren Gele mit geringerem Vernetzergehalt besitzen. In den Fällen mit hohen Vernetzergehalten kommt es zu Knäuelung der Polymerketten durch starke intramolekulare Vernetzung, so daß Mikrogele entstehen, die miteinander durch zahlreiche Vernetzungsstellen verbunden sind. Zwischen den von den Mikrogelen ausgehenden Molekülfäden, die das Gerüst des Gels bilden, entstehen dann große Poren.
Solche Gele zeigen unter dem Elektronenmikroskop eine Struktur, während die weniger stark vernetzten Typen vollkommen homogen erscheinen.

Bei einer Reihe von in Gegenwart von Wasser hergestellten Perlpolymerisaten lag die Gesamtkonzentration an Monomerem zwischen 36 und 38 Gew.-% (Gew.-% Monomere in der Innenphase) bei konstantem Vernetzergehalt (20 Gew.-% der Monomeren). Unter dem Lichtmikroskop erscheinen diese Perlen als klare, regelmäßige, kugelige Teilchen (siehe Abb. 1a und 1b). Dieses klare und durchsichtige Aussehen ist ein Zeichen dafür, daß die Perlen zumindest keine starken Heterogenitäten und relativ niedrige Ausschlußmolekulargewichte besitzen. Die Innenphase enthielt die beiden Copolymeren, Initiator und Wasser. Bei zwei Versuchen (siehe Ansatz 104, 105, Tab.1, Kap. 5.1) wurde zusätzlich Natriumchlorid eingesetzt, um die Löslichkeit des Copolymerisates in Wasser zu erniedrigen. Hierdurch sollen die Polymerisate eine gewisse Heterogenität und somit ein höheres Ausschlußmolekulargewicht gegenüber den nur in Wasser polymerisier-

ten Gelen erhalten.

Ähnliche Perlpolymerisate, hergestellt mit Monomerkonzentrationen von 27 Gew.-% und höheren Vernetzerkonzentrationen (28,6 bis 35 Gew.-% der Monomeren), wurden ebenfalls untersucht. Die so erzeugten Perlen sind schwach trüb und milchig. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen die Perlen opak (siehe Abb.1c). Die Polymerisate bestehen aus Konglomeraten, die aus vielen kleinen einzelnen Perlen zusammengesetzt sind. Deshalb wurden sie bei der Aufarbeitung durch kräftiges Rühren auseinandergeschlagen. Ein vollständiges Sieben dieser Perlen war trotzdem nicht möglich.

5.1 Quellungsversuche

Aus der Quellung homogen-vernetzter Gele läßt sich auf die mittlere Porengröße eines Gels schließen, da der Grad der Quellung bei ein und demselben Lösungsmittel allein von der Dichte der Vernetzungsstellen abhängt. Eine hohe Vernetzungsdichte führt auch in einem guten Lösungsmittel nur zu einer schwachen Quellung des Gels, da die Lösungsmittelaufnahme durch das Netzwerk begrenzt wird. Gele, die eine starke Quellung aufweisen, besitzen größere Poren als solche, die nur wenig quellen.

Zur quantitativen Bestimmung der Quellfähigkeit der in Kapitel 5 beschriebenen Gele wurde die Volumenzunahme des vernetzten Polymeren in einem Überschuß des Lösungsmittels gemessen. Hierzu gibt man eine abgewogene Menge des Polymeren in einen graduierten Mischzylinder, setzt einen Überschuß Lösungsmittel dazu, schüttelt kräftig durch und läßt dann das Gel 2 Tage sedimentieren. Danach wurden die spezifischen Gelbettvolumina V_G (ml/g) abgelesen. Bei den Polyacrylamidgelen wurde Wasser als Quellungsmittel verwendet und die Bestimmung bei Raumtemperatur durchgeführt.

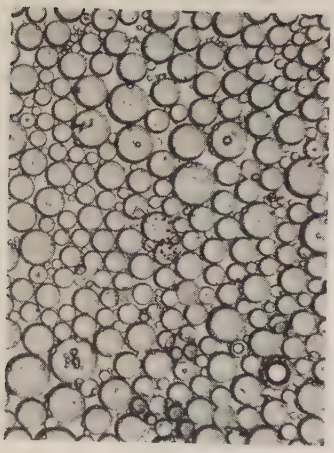


Abb.1a

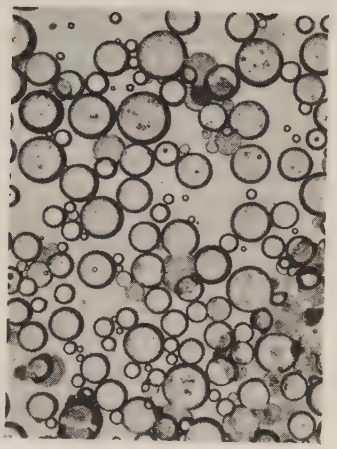


Abb.1b

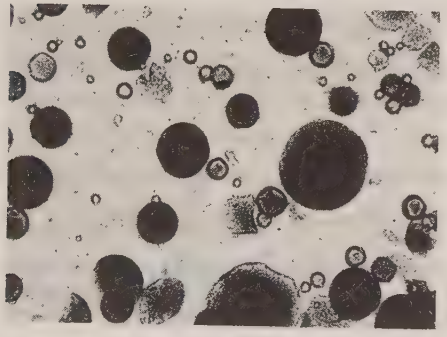


Abb.1c

Abb.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgelen (gequollen in Wasser, 63-fache Vergrösserung).
Abb.1a: Ansatz 101, Tab.1
Abb.1b: Ansatz 105, Tab.1
Abb.1c: Ansatz 122, Tab.2.

Tabelle 1: Quellungseigenschaften einiger in Gegenwart von Wasser hergestellter Polyacrylamidgele, dargestellt aus Acrylamid und 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid (Gesamtmonomerkonzentration: 37 Gew.-%).
V_G = spezifisches Gelbettvolumen in Wasser (23°C) (ml/g)
A = Innenphase bestehend aus beiden Comonomeren und 100 ml Wasser.

Versuch Nr.	Innenphase	V_G
101 *)	A	3,45
102 *)	A	4,00
104	A + 3 Gew.-% NaCl	3,50
105	A + 6 Gew.-% NaCl	4,05

*) Gele 101 und 102 unterscheiden sich bei der Herstellung nur durch die Rührgeschwindigkeit (101 = 380 U/min, 102 = 450 U/min).

Die Ergebnisse dieser Quellungsversuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Gele zeigen eine geringe Quellung, was auf den hohen Vernetzergehalt zurückzuführen ist. Der Zusatz von Natriumchlorid hat keinen Einfluß auf die Gelbettvolumina der Gele. Daraus kann man jedoch nicht zwingend schließen, daß diese Gele gleichmäßig vernetzt sind. Unter dem Lichtmikroskop sind keine Unterschiede zwischen den mit und ohne NaCl-Zusatz erhaltenen Perlen zu sehen (vgl. Abb. 1a mit Abb.1b).

Eine andere Versuchsreihe wurde mit steigendem Vernetzergehalt und niedrigerer Gesamtmonomerkonzentration (25,9 - 27,8 Gew.-%) durchgeführt.

Tabelle 2: Quellungseigenschaften einiger in Gegenwart von Wasser hergestellter Polyacrylamidgele dargestellt aus Acrylamid und steigender Konzentration an N,N´-Methylenbisacrylamid.

Versuch Nr.	Gesamtmonomerkonzentration (Gew.-%)	Vernetzer (Gew.-%)	V_G (ml/g)
121	25,9	28,6	7,50
122	26,3	30,0	7,35
123	27,8	35,0	6,50

Die erhaltenen Gele quellen stärker als die vergleichbaren Polyacrylamidgele, die in konzentrierter Lösung hergestellt wurden (vgl. Tab.1 und 2). Wie zu erwarten war, nimmt die Quellung mit steigendem Vernetzergehalt ab.

Man kann sich vorstellen, daß durch den Verdünnungseffekt eine verstärkte intramolekulare Vernetzung eintritt, was auch durch den hohen Vernetzergehalt begünstigt wird. Daher bilden sich stark vernetzte Zentren, die untereinander nur wenige Vernetzungsstellen aufweisen, woraus die größeren Quellungen der Gele der Tabelle 2 resultieren.

5.2 Trenneigenschaften

Die Trenneigenschaften der Gele bei der Gelchromatographie werden untersucht, indem man Chromatographiesäulen mit in Wasser gequollenem Gel füllt und die Auftrennung einer Reihe von Polyethylenglykolen und Dextranen als Testsubstanzen im Eluat ermittelt. Der Versuchsaufbau der Gelchromatographie ist in Kapitel 10.5 beschrieben. Die verwendeten Polyethylenglykole und Dextrane sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Da Wasser ein gutes Lösungsmittel für das Homopolyacrylamid ist und dieses sich selbst in konzentrierter NaCl-Lösung nicht aussalzen läßt, kann man annehmen, daß die Affinität zwischen Gel und Elutionsmittel größer ist als zwischen Gel und den zu trennenden Substanzen. Adsorptionseffekte werden dadurch unterdrückt.

In Abbildung 2 ist eine Überlagerung der Elutionskurven der Polyethylenglykole aufgetragen. Trägt man die Elutionsvolumina der einzelnen Testsubstanzen gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts auf, so erhält man Kurven wie in den Abbildungen 3 und 4, aus denen sich die Ausschlußmolekulargewichte der getesteten Gele ermitteln lassen.
Aus den in den Abbildungen 3 und 4 dargestellten Kurven, die Gele mit hohen Vernetzergehalten und hohen Gesamtmonomerkonzentrationen entsprechen, läßt sich ableiten, daß die Gele weitgehend aus einzelnen solvatisierten Molekülfäden bestehen, die gleichmäßig vernetzt sind. Wie bei den Quellungsversuchen schon angedeutet wurde, hat der Zusatz von Natriumchlorid keinen oder nur einen geringfügigen Einfluß auf die Heterogenität der Gele. Die Maschenweite des Copolymerisats scheint

nur von der Vernetzermenge abhängig zu sein, wie dies bei einer typischen homogenvernetzenden Copolymerisation der Fall ist. Die mit hohen Monomerkonzentrationen und hohem Vernetzergehalt hergestellten Gele besitzen sehr niedrige Ausschlußmolekulargewichte zwischen 800 und 1200 (siehe Tab.4).

Tabelle 3: Testsubstanzen, die zur gelchromatographischen Untersuchung der vernetzten Polyacrylamidgele verwendet wurde.

Testsubstanz	Nr.	M (g/mol)	log M
Ethylenglykol [d]	I	62	1,792
Diethylenglykol [a]	II	106	2,025
Polyethylenglykol 200 [c]	III	200	2,301
Polyethylenglykol 400 [c]	IV	400	2,602
Polyethylenglykol 600 [a]	V	600	2,778
Polyethylenglykol 1500 [c]	VI	1500	3,176
Polyethylenglykol 3000 [b]	VII	3000	3,477
Polyethylenglykol 4000S [c]	VIII	4000	3,602
Polyethylenglykol 6000 [b]	IX	6000	3,778
Polyethylenglykol 10000S [c]	X	10000	4,000
Polyethylenglykol HM 100 [c]	XI	ca. 35000	4,544
Polyethylenglykol [b]	XII	$3,8 \cdot 10^6$	6,580
Glucose	XIII	180	2,260
Dextran 10 [e]	XIV	10000	4,000
Dextran 20 [e]	XV	20000	4,301
Dextran 40 [e]	XVI	40000	4,602
Dextran 70 [e]	XVII	70000	4,845
Dextran 110 [e]	XVIII	110000	5,041
Dextran 150 [e]	XIX	150000	5,176
Dextran 250 [e]	XX	250000	5,398
Dextran 500 [e]	XXI	500000	5,699
Dextran 2000 [e]	XXII	$2 \cdot 10^6$	6,301

a) Produkte der Firma Merck, Darmstadt
b) Produkte der Chemischen Werke Hüls, Marl
c) Produkte der Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt/M.
d) Produkt der Firma Riedel-de-Haen AG., Seelze/Hannover
e) Produkte der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden
f) Außer I, II und XIII: Mittlere Molekulargewichte nach Angabe der Hersteller.

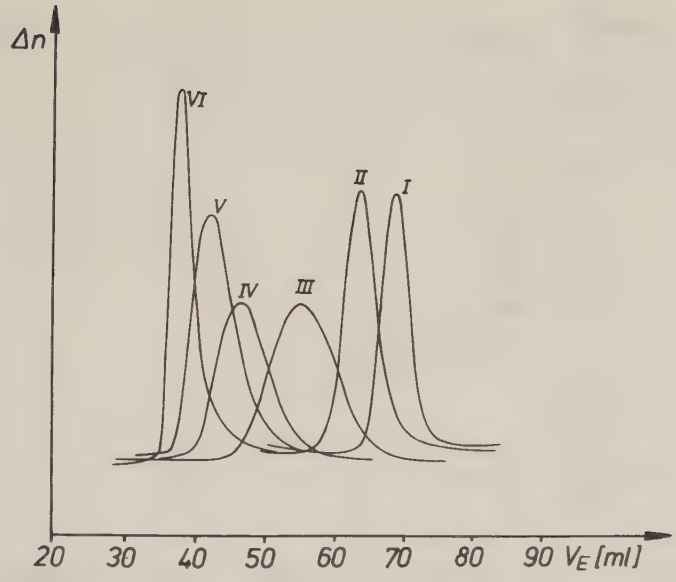


Abb. 2: Superposition der Elutionsdiagramme der Oligo- und Polyethylenglykole (Testsubstanz-Nr. siehe Tab. 3) getrennt an einem mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgel (Ansatz 101, Tab. 3).
Probenaufgabe: 0,2 ml 10%-ige wäßrige Lösung.

Tabelle 4: Ausschlußmolekulargewichte von mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid (bezogen auf die Gesamtmonomerkonzentration) hergestellten Polyacrylamidgelen.

Versuch Nr.	Innenphase	Ausschlußmolekulargewicht
101	A	800
104	A + 3 Gew.-% NaCl	1100
105	A + 6 Gew.-% NaCl	1200

Aus den Abbildungen 3 bis 5 kann man folgendes entnehmen:

1) Die getrennten Stoffe erscheinen im Eluat in der Reihenfolge abnehmenden Molekulargewichts.

2) Die Peaks sind symmetrisch, Adsorptionserscheinungen können deshalb ausgeschlossen werden.

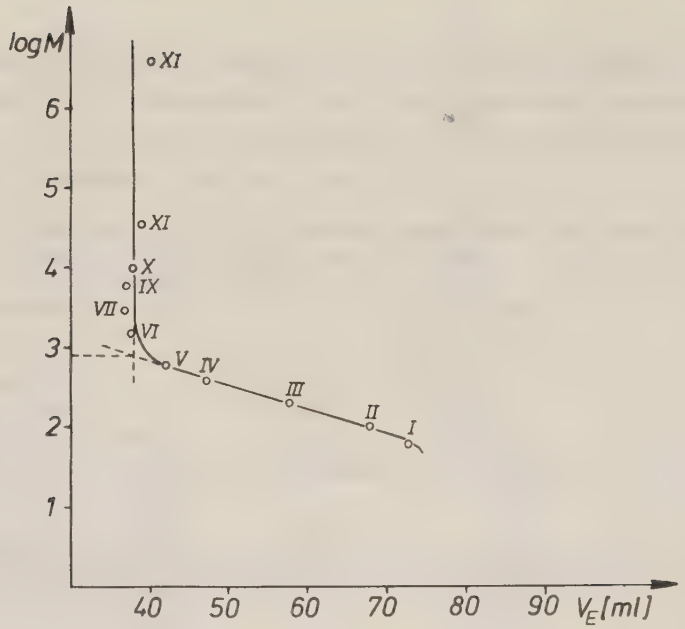


Abb.3: Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für ein in Gegenwart von Wasser hergestelltes Polyacrylamidgel (Ansatz 101, Tab.3) (ohne Natriumchlorid-Zusatz).
Vernetzergehalt: 20 Gew.-% ; Testsubstanzen (Substanz-Nr. siehe Tab.3): Oligo- und Polyethylenglykole; Chromatographiesäule: 50 x 1,5 cm ; V_T = 90 ml ; Druck: 4 bar ; Durchflußgeschwindigkeit: 30 ml/h .

Für die Güte der mit einem Gel erzielbaren Trennung ist die Größe des Innenvolumens von erheblicher Bedeutung. Im Eluat erscheinen Substanzen nur innerhalb eines Volumens, das dem Innenvolumen entspricht.

Die Gele der Tabelle 4 weisen ein geringes Innenvolumen V_I auf, das direkt von der mittleren Porengröße der Gelmatrix abhängt. Im allgemeinen wird bei homogen-vernetzten Gelen das für die Trennung zur Verfügung stehende Volumen V_I mit steigender Vernetzermenge geringer. Der Anteil des Porenvolumens kann in weiten Grenzen schwanken, je nach Vernetzergehalt im Monomerengemisch. Normalerweise findet man Werte von $V_I \approx 0{,}4$ bis $0{,}5\ V_T$.

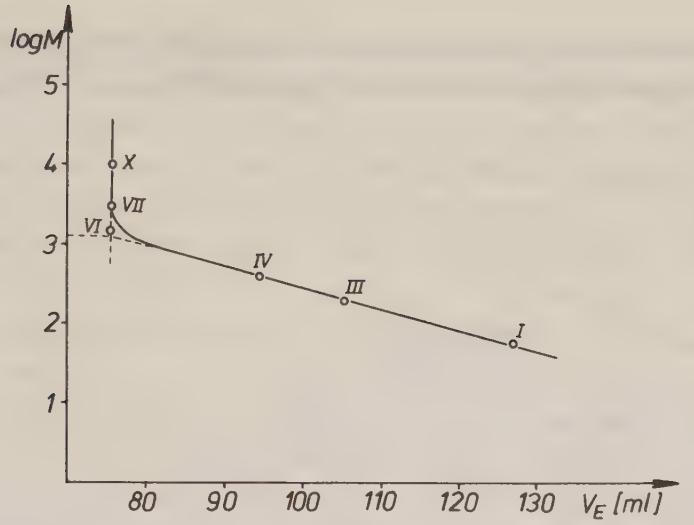


Abb.4: Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für ein mit Natriumchlorid-Zusatz (6 Gew.-% bezogen auf die Innenphase) hergestelltes Polyacrylamidgel (Ansatz Nr. 105, Tab.4).
Vernetzergehalt: 20 Gew.-% ; Testsubstanzen (Substanz-Nr. siehe Tab.3): Oligo- und Polyethylenglykole ; Chromatographiesäule: 100 x 1,5 cm ; V_T = 177 ml ; Druck: hydrostatischer Druck des Elutionsmittels (2 m Wassersäule); Durchflußgeschwindigkeit: 7,7 ml/h .

Die hier in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgele zeigen für V_I Werte von 0,29 bis 0,40 V_T . Das geringe Innenvolumen V_I ist auf die hohe Vernetzungsdichte der Gele zurückzuführen.

Zur Bestimmung des Innenvolumens V_I wurde vom Elutionsvolumen V_E (ermittelt mit Ethylenglykol) das Ausschlußvolumen V_0 subtrahiert. Das Ausschlußvolumen V_0 ist gleich dem Elutionsvolumen eines hochmolekularen Polymeren, das nicht in die Poren des Gels eindringen kann. In diesem Fall wurde dazu Polyethylenglykol ($\overline{M} = 3,8 \cdot 10^6$) eingesetzt.

Die Trenneigenschaften der mit höherem Vernetzeranteil (28,6-35,0 Gew.-%) erzeugten Polyacrylamidgele lassen sich nur schwierig untersuchen. Eine gute Säulenpackung konnte nicht erzielt werden, da die Perlen nicht frei rollten, sondern an der Wand der Säule hängenblieben. Abbildung 5 zeigt, daß die Testsubstanzen im Eluat

sehr spät erscheinen. Substanzen mit Molekulargewichten über 1 Million werden erst mit einem Volumen eluiert, das 0,56 V_T entspricht.

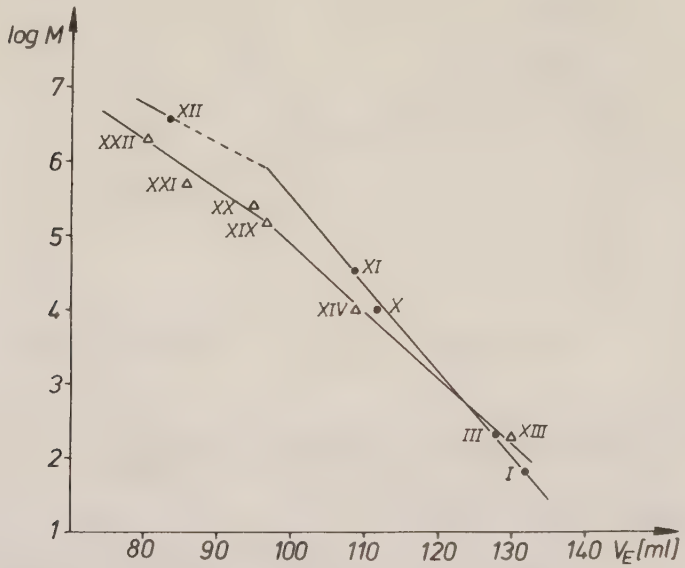


Abb.5: Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für ein mit 30 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid in Gegenwart von Wasser hergestelltes Polyacrylamidgel (Ansatz 122, Tab.2).
Chromatographiesäule: 91 x 1,43 cm ; V_T = 143 ml ; Druck: hydrostatischer Druck des Elutionsmittels (2 m Wassersäule); Durchflußgeschwindigkeit: 17 ml/h.
- ● - ● - Polyethylenglykole
- Δ - Δ - Dextrane

Aus der Eichkurve (Abb.5) läßt sich kein Ausschlußmolekulargewicht ermitteln. Die Ausschlußgrenze liegt sehr hoch. Diesen Effekt kann man erklären, indem man annimmt, daß in verdünnter Lösung eine verstärkte Mikrogelbildung eintritt. Die Gele besitzen daher eine bimodale Porenverteilung, die sich in der log M - V_E - Eichkurve durch einen Knick äußert. Die hohe Ausschlußgrenze der Gele ist ein Zeichen dafür, daß die Vernetzung nicht gleichmäßig erfolgt, sondern eine gewisse Heterogenität vorliegt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die mit hohen Monomerkonzentrationen und 20 Gew.-% Vernetzergehalt hergestellten Polyacrylamidgele ein niedriges Ausschlußmolekulargewicht besitzen, eine geringe Quellung und gute mechanische Eigenschaften zeigen, was eine schnelle Durchflußgeschwindigkeit des Elutionsmittels erlaubt (Gel des Ansatzes Nr. 101 wurde bei einem Druck von 4 bar mit einer linearen Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/cm^2/h betrieben). Die Gele lassen sich gut aufarbeiten.

Das Hauptziel bei der Darstellung von Polyacrylamidgelen für die Gelchromatographie ist aber das Erreichen möglichst hoher Ausschlußgrenzen. Dies sollte im Falle homogen-vernetzter Gele gelingen, wenn man die Konzentration des Vernetzers immer mehr verringert. Es ist jedoch bekannt, daß auf diese Weise erhaltene Gele mechanisch so instabil sind, daß man sie nicht mehr in der Gelchromatographie verwenden kann; deshalb wurde auf die Herstellung solcher Gele verzichtet.

Gele, die in verdünnten Lösungen und mit höheren Vernetzergehalten dargestellt wurden, haben hohe Ausschlußgrenzen und zeigen stärkere Quellung. Durch ihre ungünstigen Packungseigenschaften sind sie aber nur begrenzt einsetzbar.

6. Heterogen-vernetzende Copolymerisation [19)]

Die Darstellung von Polymeren mit makroporöser Struktur wurde zuerst bei der Copolymerisation von Styrol und Divinylbenzol in Gegenwart von Verdünnungsmitteln, die aus dem Endprodukt entfernt werden können, genauer untersucht. Auf diese Weise erhaltene Copolymere sind je nach Versuchsbedingungen mehr oder weniger inhomogen. Die Bildung von heterogenen Netzwerken durch Verzweigung und Vernetzung des Polymeren in verdünnten Systemen läßt sich qualitativ beschreiben.

Während der vernetzenden Copolymerisation treten neben intermolekularen Vernetzungen einzelner Polymerketten auch intramolekulare Vernetzungen innerhalb einer Molekülkette auf. Die Wahrscheinlichkeit der intramolekularen Vernetzung nimmt mit steigender Verdünnung des Systems zu, da hier die einzelnen Ketten weiter voneinander getrennt sind. Das ist der Fall bei niedrigen Umsätzen der Copolymerisation, wobei das entstehende Copolymere stark mit Monomeren und Lösungsmittel verdünnt ist. Im Reaktionsgemisch bilden sich voneinander unabhängige stark vernetzte Zentren, die sich erst im weiteren Verlauf der Copolymerisation zu einem Netzwerk vereinigen können. Die Bildung stark vernetzter Zentren wird begünstigt durch eine hohe Vernetzerkonzentration, sowie durch steigende Verdünnung des Systems und Verschlechterung der Lösungsmittelgüte. Bei Copolymeren, die ohne Zusatz von Verdünnungsmitteln hergestellt werden, ist die Wahrscheinlichkeit der intramolekularen Vernetzung geringer; dadurch ist die Bildung eines "unendlich ausgedehnten" Netzwerks (ein Netzwerk, das den ganzen polymerisierenden Tropfen umfaßt) schon bei niedrigem Umsatz möglich und es können keine makroporösen Strukturen mehr gebildet werden.

Die Heterogenität des gebildeten Netzwerks wächst:

a) mit steigender Konzentration des Vernetzers;

b) mit steigender Konzentration des Verdünnungsmittels.
Damit nimmt der Quellungsgrad bzw. Solvatationsgrad infolge der stärker begünstigten intramolekularen Vernetzung ab, was zu einer Entmischung führt;

c) mit abnehmendem Solvatationsvermögen des Verdünnungsmittels für das Polymere;

d) mit steigender Reaktivität der Vinylgruppen der Divinylverbindung im Vergleich zur Monovinylverbindung.
Diese führt im Anfangsstadium der Copolymerisation zu einer verstärkten intramolekularen Vernetzung. Dadurch wird die Bildung stärker vernetzter Zentren, die eine Voraussetzung für die Entstehung makroporöser Gele ist, gefördert.

Entmischungserscheinungen sind allgemein thermodynamisch geregelt. Die theoretische Behandlung der Bildung hetero-phasiger Strukturen ist äußerst kompliziert. Es ist nicht ausgeschlossen, daß kinetische Vorgänge ebenfalls eine Rolle spielen, speziell im Hinblick auf die Morphologie der getrennten Phasen.

Dusek [20] hat ein vereinfachtes Modell der Phasenentmischung in dreidimensionalen Netzwerken entwickelt. Er setzt voraus, daß bei der vernetzenden Copolymerisation ein thermodynamisch stabiler Zustand herrscht und daß das Netzwerk isotrop ist (d.h. die Querverbindungen in dem Netzwerk sind statistisch verteilt). Nach diesem Modell soll ein Polymeres in homogener Lösung solange vernetzt werden (d.h. es wird in Gegenwart von Verdünnungsmittel solange polymerisiert), bis das Netzwerk die maximale Quellung in dem Verdünnungsmittel (in der Mischung Verdünnungsmittel - Monomeres) erreicht. Da die Konzentration des Verdünnungsmittels im Netzwerk nicht höher sein kann als die maximale Quellung des Netzwerks im Gleichgewicht mit diesem Verdünnungsmittel, muß sich das homogene System in zwei Phasen trennen. Nach der Phasenentmischung ändert sich das Volumen der Netzwerkphase, entweder nimmt es ab (das Netzwerk entquillt) oder zu (die Monomeren gehen in die zuerst stark entquollene Netzwerkphase über).

Die Faktoren, die nach dem Dusekschen Modell die Entmischung beeinflussen, sind u.a. die Volumina der Komponenten, die Anfangskonzentrationen des Verdünnungsmittels und des Vernetzers, sowie der Polymerisationsumsatz. Je nach Versuchsbedingungen tritt die Entmischung vor oder nach dem Gelpunkt (Bildung eines primären Netzwerks) auf. Bei hoher Verdünnung und hoher Konzentration an Divinylverbindungen kann die Entmischung vor Erreichen des Gelpunkts stattfinden. Dies führt zur Bildung einer Dispersion des Polymeren im Verdünnungsmittel und zu einer porösen Struktur. Wenn die Entmischung erst in einem ausgebildeten Netzwerk eintritt, sollte das zu einer Kontraktion des Gels unter Ausstoßung des Verdünnungsmittels führen (Synärese). Bleibt die Netzwerkphase isotrop, so ist dies mit einer

Expansion des Netzwerks verbunden (inverse Synärese). Tritt während der vernetzenden Copolymerisation keine Entmischung auf, d.h. wird die maximale Quellung des Netzwerks nicht erreicht, so erhält man Polymere, die stärker in Verdünnungsmitteln quellen als ein mit gleichem Vernetzergehalt hergestelltes homogen-vernetztes Gel. Dies ist auf die inhomogenere Verteilung der Vernetzungspunkte zurückzuführen.

Die besten mechanischen Eigenschaften zeigen die Gele, bei deren Herstellung Gelpunkt und Entmischung zusammenfällt. Tritt die Entmischung vor dem Gelpunkt auf, erhält man ein sprödes Material, das leicht bei der Aufarbeitung zerfällt; tritt sie nach dem Gelpunkt auf, so zeigen die Gele nur geringe permanente Porosität.

7. Einfluß der Versuchsbedingungen auf die Eigenschaften der heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele

Durch vernetzende Copolymerisation in Gegenwart eines inerten Lösungsmittels kann man großporige Gele mit einem dichten Netzwerk erzeugen. Diese makroporösen Copolymeren sollten sich gut als Gele für die Gelchromatographie eignen, da sie neben dem starren Aufbau eine hohe Ausschlußgrenze besitzen.

Als inerte Komponente verwendet man nieder- oder makromolekulare Stoffe, welche sich in den beiden Monomeren gut auflösen oder mit ihnen mischbar, für das Polymere aber ein Fällungsmittel sind.

Zur Herstellung makroporöser Polyacrylamidgele wurden Polymerisationen in Gegenwart von Verdünnungsmitteln durchgeführt. Die Variablen, die Einfluß auf die Form und Größe der Perlen haben, wurden nur geringfügig verändert. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 16 (Kap. 10.5) zusammengefaßt. Die Quellungsversuche und gelchromatographischen Trennungen wurden bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt. Das Quellungs- bzw. Elutionsmittel war in allen Fällen Wasser. Die Trenneigenschaften der Polyacrylamidgele werden durch ihr Ausschlußmolekulargewicht charakterisiert. Als Testsubstanzen dienten Polyethylenglykole und Dextrane, die in Tabelle 3 zusammengestellt sind.

Folgende Faktoren beeinflussen die Entstehung makroporöser Gele:
Die Art der monomeren Vinylverbindung, die Konzentration und Art der Vernetzungskomponente, sowie die Konzentration des Verdünnungsmittels und des Initiators.

7.1 Die Zusammensetzung der Inertkomponente

Die Heterogenität eines Netzwerks wächst mit steigender Konzentration und abnehmendem Solvatationsvermögen des Verdünnungsmittels. Man teilt die Verdünnungsmittel in Quellungs- und Fällungsmittel ein. Im Normalfall erzielt man durch Zugabe von Fällungsmittel eine höhere Heterogenität und erreicht damit höhere Ausschlußmolekulargewichte. In einigen Fällen gelingt es, durch Gemische aus Fällungs- und Quellungsmittel in einem engen Mischungsbereich höhere Ausschluß-

molekulargewichte zu erhalten als mit den reinen Komponenten [19].
Bei hohem Fällungsmittelgehalt besitzen die Copolymeren eine sehr geringe Festigkeit und sind brüchig. Je schlechter die Lösungseigenschaften der Inertkomponente für das Homopolymere sind, desto größer wird die mittlere Porengröße des Gels sein. Einer derartigen Erhöhung des Ausschlußmolekulargewichts sind Grenzen gesetzt. Die Phasentrennung darf nicht vor Erreichen des Gelpunkts eintreten, da sonst eine Suspension von Mikrogelen entstehen kann.

Ein gegebenes Lösungsmittel kann durch Mischen mit Wasser so eingestellt werden, daß man die Porengröße in weiten Grenzen variieren kann. Durch Zugabe von Wasser wird das Lösungsmittel so verändert, daß die Lösungseigenschaften für das Polymere verbessert werden und somit Gele mit kleineren Poren entstehen. Als Beispiele für Lösungsmittel, in denen das Monomersystem Acrylamid/N,N´-Methylenbisacrylamid löslich ist, wurden Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid genannt [21]. Im allgemeinen sind auch Alkohole mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie Methanol, Ethanol, n-Propanol etc., geeignete Lösungsmittel für diese Polymerisation. Da jedes Lösungsmittel ein anderes Lösungsvermögen für das Monomere besitzt, wird auch jedes einen unterschiedlichen Einfluß auf die Porosität oder die Durchlässigkeit der Gele besitzen.

Als Inertkomponente wurde eine Mischung aus Wasser und Methanol eingesetzt. Die Konzentration des Verdünnungsmittelgemisches betrug zwischen 57 und 79 Gew.-% der Monomerphase. Der Volumenanteil an Methanol wurde von 0 bis 0,8 variiert. Die Änderung in der Struktur dieser erhaltenen Polyacrylamidgele läßt sich visuell verfolgen. Es ist bekannt, daß man aus dem Aussehen der Copolymeren Rückschlüsse auf die Art der Poren ziehen kann. Qualitativ gilt, daß sich die Trübung mit steigender Porengröße und mit größerem Unterschied in der Brechzahl zwischen der Polymersubstanz und dem die Poren ausfüllenden Medium erhöht.

Die Abbildungen 6 bis 8 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von heterogen-vernetzten Copolymeren des Acrylamids. Bei Zugabe von 20 Vol.-% Methanol bezogen auf das Verdünnungsmittelgemisch erhält man Copolymere, die noch durchsichtig und klar aussehen (Abb.6); bei 60 Vol.-% Methanol sind die Perlen trüb und opak. Sie zeigen im trockenen und gequollenen Zustand keinen Oberflächenglanz (Abb.7).

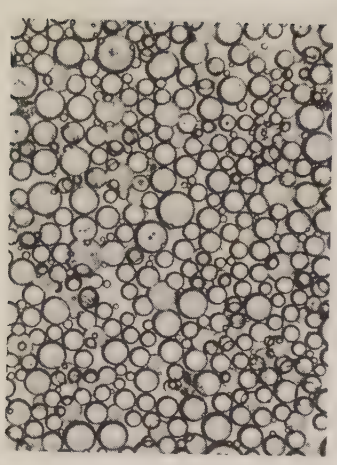


Abb. 6

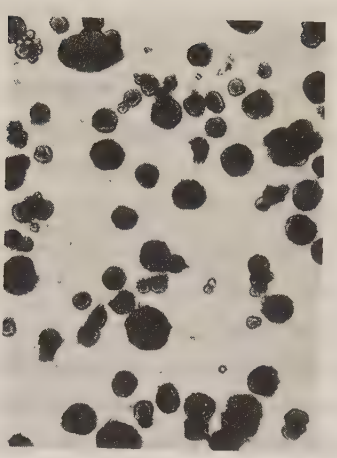


Abb. 7

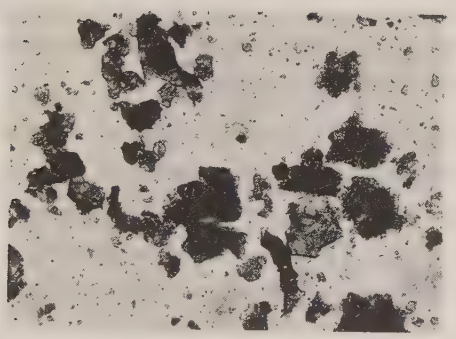


Abb. 8

Abb. 6-8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von in Wasser gequollenen heterogen-vernetzten Polyacrylamidgelen (63-fache Vergrößerung).

Abb. 6: Ansatz 106, Tab. 5 (20 Vol.-% MeOH)
Abb. 7: Ansatz 128, Tab. 5 (60 Vol.-% MeOH)
Abb. 8: Ansatz 114, Tab. 5 (80 Vol.-% MeOH)

Bei Zugabe von 80 Vol.-% Methanol erhält man keine Perlen (Abb.8). In diesem Fall sind die Polymerisationsgeschwindigkeiten nach Erreichen des Gelpunkts stärker beschleunigt als bei den Ansätzen mit niedrigerem Methanolgehalt, was sich in einem sprunghaften Temperaturanstieg und momentaner Trübung des Ansatzes äußert. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt: Beim ersten Mal wurde 6 h bei 50°C polymerisiert, beim zweiten Versuch wurde 1 h auf 30°C erwärmt und da keine Rotation zu beobachten war die Temperatur für 3 h auf 40° erhöht. Auch im zweiten Fall verlief die Reaktion analog mit Temperaturanstieg und momentaner Trübung. Man erhielt in beiden Fällen nur unregelmäßige Teilchen. Wahrscheinlich verdampft das Methanol durch die Reaktionswärme in den polymerisierenden Tröpfchen, was zum Auseinanderplatzen der Perlen führt. Deshalb wurden keine weiteren Versuche mit so hohen Konzentrationen an Verdünnungsmitteln (80 Vol.-% Methanol in der Inertkomponente) mehr durchgeführt. Die Bestimmung der Ausschlußgrenze war an diesem Material nicht möglich. Aus dem gleichen Grund sind die spezifischen Schütt- und Gelbettvolumina mit den gemessenen Werten der übrigen Ansätze nicht vergleichbar.

Bei homogen-vernetzten Copolymeren kann man durch die Bestimmung der Quellung Hinweise auf den strukturellen Aufbau erhalten, da Vernetzungsdichte und Gleichgewichtsquellung in einer direkten Abhängigkeit stehen [22].

Bei makroporösen Copolymeren stößt man auf Schwierigkeiten, wenn man ihre Quellungseigenschaften vergleichen will, da das Quellvermögen nur wenig über ihre Vernetzungsdichte und Struktur aussagt. Die Polymeren bestehen im trockenen Zustand aus einem Anteil permanenter, mit Luft gefüllter Poren und dem polymeren Netzwerk, das noch Quellfähigkeit besitzt. Wenn die Polymerisate mit einem Lösungsmittel versetzt werden, dringt dieses in die permanenten Poren ein und verdrängt die Luft. Gleichzeitig werden die Polymerfäden solvatisiert und das Netzwerk quillt. Da die Polymerfäden während verschiedener Umsätze und Polymerisationsbedingungen gebildet werden, sind sie verschieden stark vernetzt und deshalb auch unterschiedlich solvatisierbar.

Um Aussagen über Strukturänderungen durch Solvatation an heterogen-vernetzten Copolymeren zu erhalten, benutzt man die Volumenquellung. Sie stellt das Volumenverhältnis des Polymeren im gequollenen zum trockenen Zustand dar. Unter

der Annahme, daß im gequollenen und ungequollenen Zustand die gleiche Packung der Perlen vorliegt, kann die Volumenquellung aus der Beziehung ermittelt werden:

$$B = \frac{V_G}{V_{sch}} \qquad (4)$$

Diese Gleichung wird zur Bestimmung der Volumenquellung bei Perlcopolymeren meistens verwendet.

Das Gesamtvolumen an Inertkomponente wurde zwischen 100 und 250 ml variiert, bei einer konstanten Monomerenmenge von 62,5 g. Das Verhältnis g Monomermischung zu g Inertkomponente betrug 1 : 1,33 bis 1 : 3,67.

Abbildung 9 zeigt den Verlauf der nach Gleichung (4) bestimmten Volumenquellung einiger heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele in Abhängigkeit von dem Anteil des Verdünnungsmittels Methanol in der wäßrigen Phase, wobei die Vernetzerkonzentration 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid bezogen auf das Monomerengemisch und das Gesamtvolumen der Inertkomponente 100 bzw. 150 ml betrug.

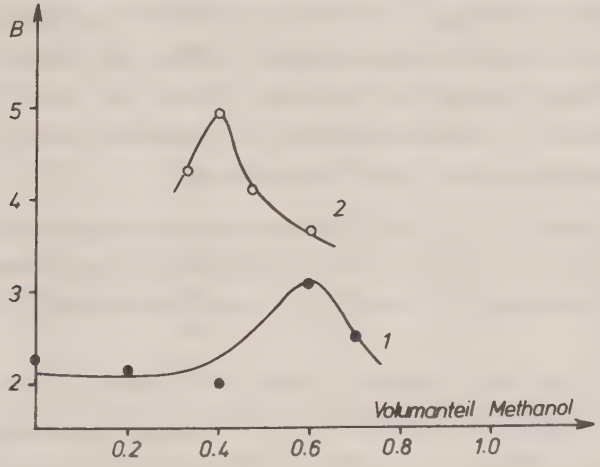


Abb. 9: Volumenquellung B heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele, dargestellt mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid in Abhängigkeit von der Konzentration des Verdünnungsmittels (Methanol) nach Werten der Tabelle 5.
● - ● Gesamtvolumen der Inertkomponente: 100 ml
o - o Gesamtvolumen der Inertkomponente: 150 ml

Die Kurve 1 der Abbildung 9 zeigt bis zu einem Methanolanteil von 0,4 innerhalb der Fehlergrenze keine Änderung der Volumenquellung. Bei einem Methanolanteil von 0,4 bis 0,6 steigt die Volumenquellung an. Weitere Erhöhung des Methanolanteils resultiert in einer Abnahme der Volumenquellung, da in diesem Bereich durch das Auftreten permanenter Porosität das spezifische Schüttvolumen zunimmt. Mit einem Methanolanteil von 0,8 erhält man nur noch trübe, unregelmäßig geformte, brüchige Teilchen (vgl. Abb.8).

Bei Kurve 2 der Abbildung 9 beobachtet man den gleichen Effekt. Hier betrug das Gesamtvolumen der Inertkomponente 150 ml. Der Bereich, in dem man permanent poröse Gele erhält, verschiebt sich zu niedrigeren Methanolgehalten. Hier nimmt die Volumenquellung bei einem Methanolgehalt von > 0,4 wieder ab. Wie zu erwarten war, nimmt das spezifische Gelbettvolumen mit steigender Verdünnungsmittelmenge zu (siehe Tab.5).

Aus den Quellungsuntersuchungen der heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele kann nur bedingt auf ihr Verhalten in der Gelchromatographie geschlossen werden. Daher ist es unerläßlich, die Copolymeren durch das Elutionsverhalten geeigneter Testsubstanzen auf ihre gelchromatographische Eignung zu prüfen. Die benutzten Testsubstanzen waren Polyethylenglykol und fraktionierte Dextrane; sie sind in Tabelle 3 (Kap. 5.2) aufgeführt. Die chromatographischen Trennungen wurden in Wasser als Quellungs- und Elutionsmittel bei 23^{o}C durchgeführt.

Die Abbildungen 10 bis 12 zeigen die Elutionsdiagramme verschiedener Testsubstanzen (Tab.3, Kap. 5.2) an einigen mit N,N´-Methylenbisacrylamid heterogen-vernetzten Polyacrylamidgelen. Die Eichkurven sind in den Abbildungen 13 und 14 wiedergegeben.
Die Abbildung 13 zeigt, daß bei gleichem Volumenanteil an Methanol (0,4) im Verdünnungsmittelzusatz das Ausschlußmolekulargewicht mit zunehmender Verdünnung der Monomerphase ansteigt. Dazu werden in Abbildung 13 die Gele 108, 116 und 118 miteinander verglichen. Die Steigung der Geraden nimmt mit höherer Verdünnung ebenfalls zu. Das Außenvolumen ist bei diesen Gelen ungefähr gleich, während das Innenvolumen mit der Verdünnung zunimmt. Wenn man die Gele 116 und 117 vergleicht (Abb.13), beobachtet man, daß das Ausschlußmolekulargewicht mit einem höheren Volumenanteil an Methanol - bei gleicher Verdünnung der Monomerphase -

Tabelle 5:

Eigenschaften heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Verdünnungsmittelgemisches aus Wasser und Methanol. Die Konzentration des Vernetzers N,N´-Methylenbisacrylamid betrug bei allen Versuchen 20 Gew.-% der Monomermischung (Polymerisationsbedingungen siehe exp.Teil, Kap.10).

Spalte (1): Ansatz Nr.
Spalte (2): Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser
Spalte (3): Gesamtvolumen des Verdünnungsmittelgemisches (ml)
Spalte (4): V_{sch} = spezifisches Schüttvolumen (ml/g)
Spalte (5): V_G = spezifisches Gelbettvolumen in Wasser bei 23°C (ml/g)
Spalte (6): B = Volumenquellung
Spalte (7): M_{lim} = Ausschlußmolekulargewicht

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
101	0	100	1,50	3,40	2,27	800
106	0,2	100	1,40	3,00	2,14	800
108	0,4	100	1,50	3,00	2,00	750
110	0,6	100	1,40	4,30	3,07	1000
111	0,7	100	1,60	4,00	2,50	1500
114[a)]	0,8	100	—	—	—	—
117	0,33	150	1,50	6,45	4,30	10000
116	0,4	150	1,35	6,60	4,89	80000
124	0,47	150	1,55	6,55	4,22	100000
128	0,6	150	1,70	6,20	3,65	500000
118	0,4	200	1,90	8,25	4,34	$2 \cdot 10^6$
131	0,5	200	1,60	7,80	4,88	$2 \cdot 10^6$
119	0,4	250	1,60	9,70	6,06	$1 \cdot 10^6$
137	0,48	250	1,50	8,80	5,87	40000

a) man erhält keine Perlen

erhöht wird. Bei einer höheren Verdünnungsmittelkonzentration, z.B. 78 Gew.-% der Monomerphase (Gele 119 und 137, Tab.5), findet man, daß mit zunehmendem Anteil an Methanol das Ausschlußmolekulargewicht der Gele nicht mehr größer wird sondern sogar sinkt. Ein ähnliches Verhalten wurde von Heitz[7)] bei Copolymeren des Vinylacetats festgestellt.

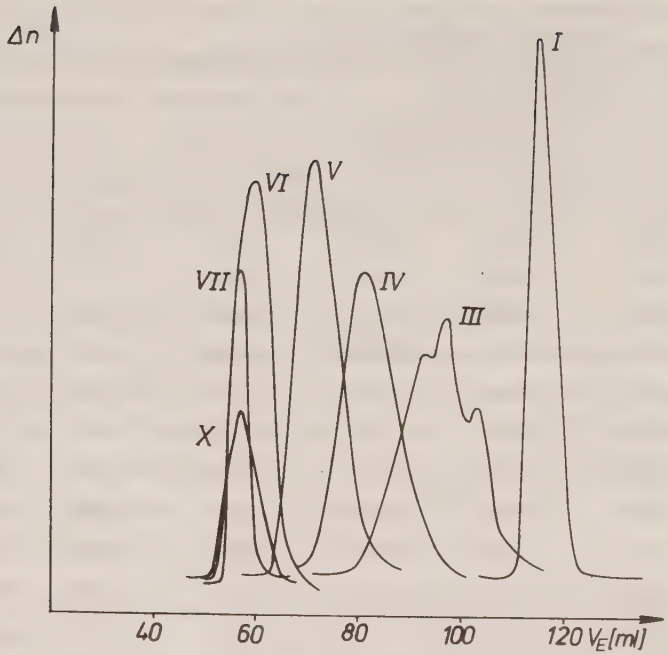


Abb.10:

Superposition der Elutionsdiagramme der Oligo- und Polyethylenglykole (Testsubstanz Nr. siehe Tab.3) getrennt an einem mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid hergestellten heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 111, Tab.5).
Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelgemisch aus Wasser und Methanol: 0,70; Gesamtvolumen des Verdünnungsmittelgemisches: 100 ml.
Es wurden jeweils 0,2 ml einer 10 %-igen wäßrigen Lösung auf die Säule gegeben.

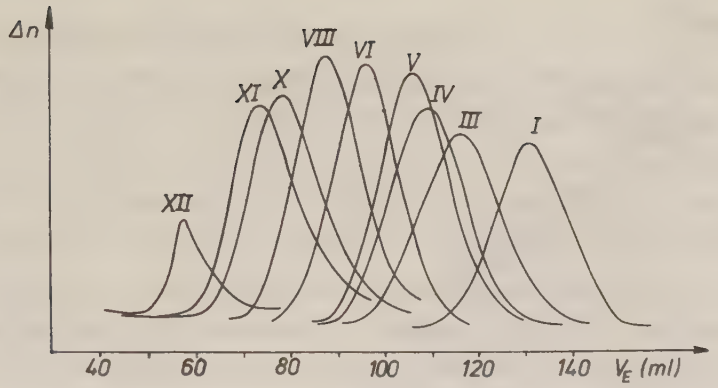


Abb.11:

Superposition der Elutionsdiagramme verschiedener Polyethylenglykole getrennt an einem mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid hergestellten heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 116, Tab.5).
Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelgemisch aus Wasser und Methanol: 0,40 ; Gesamtvolumen des Verdünnungsmittelgemisches: 150 ml .

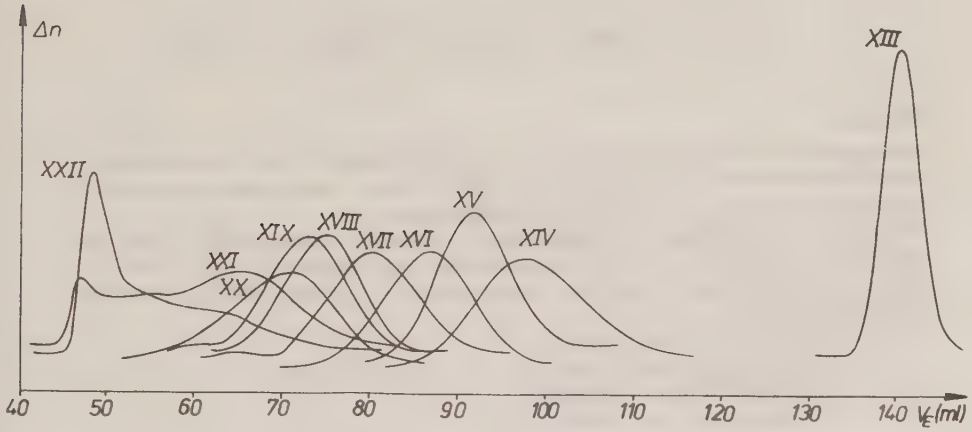


Abb.12:

Superposition einiger Elutionsdiagramme verschiedener Dextrane an einem mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid hergestellten heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 118, Tab.5).
Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelgemisch aus Wasser und Methanol: 0,40 ; Gesamtvolumen des Verdünnungsmittelgemisches: 200 ml .

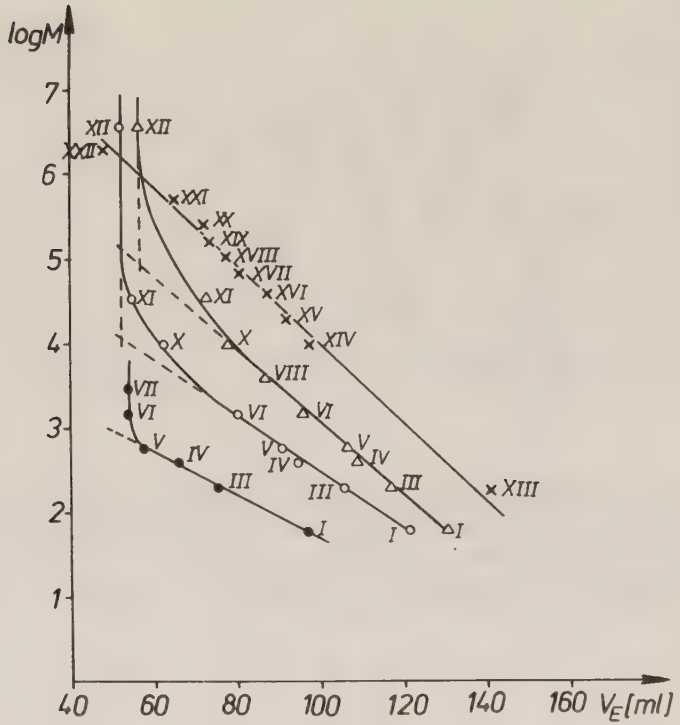


Abb.13:

Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für einige mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid hergestellte heterogen-vernetzte Polyacrylamidgele.
Testsubstanzen (Substanz Nr. siehe Tab.3): Oligo- und Polyethylenglykole und fraktionierte Dextrane; Chromatographiesäule: 91 x 1,43 cm; V_T = 143 ml; Druck: hydrostatischer Druck des Elutionsmittels (2 m Wassersäule); Durchflußgeschwindigkeit: 17 ml/h.

- ● - ● Gel Ansatz Nr. 108, Tab.5
- Δ - Δ Gel Ansatz Nr. 116, Tab.5
- o - o Gel Ansatz Nr. 117, Tab.5
- x - x Gel Ansatz Nr. 118, Tab.5

Eine Grenze für die Erhöhung des Volumenanteils an Methanol wird dann erreicht, wenn das erhaltene Gel aus unregelmäßig geformten, verklebten Partikeln besteht, was für chromatographische Zwecke von großem Nachteil ist. Andererseits läßt sich die Monomermischung zur Erhöhung der Ausschlußmolekulargewichte begrenzt verdünnen. Die in sehr verdünnten Lösungen erhaltenen Gele quellen noch stärker

und besitzen eine geringe mechanische Stabilität.

Gele, die mit einem Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelzusatz von 0,40 bis 0,50 und mit 25,5 Gew.-% Monomeranteil bezogen auf die Monomerphase (z.B. Gele 118 und 131, Tab.5) hergestellt werden, besitzen ein sehr hohes Ausschlußmolekulargewicht von ca. 10^6 (Abb.13 und 14). Zur Bestimmung der hohen Ausschlußgrenzen wurden fraktionierte Dextrane als Testsubstanz verwendet.

In Abbildung 14 kann man erkennen, daß die Polyethylenglykole früher als die Dextrane mit gleichem Molekulargewicht eluiert werden. Dies ist auf die unterschiedlichen Moleküldimensionen der beiden Substanzklassen zurückzuführen: Die Polyethylenglykole besitzen im Wasser bei 23°C eine geringe Knäueldichte und damit ein größeres Knäuelvolumen als die Dextrane gleichen Molekulargewichts[23]. Sie können

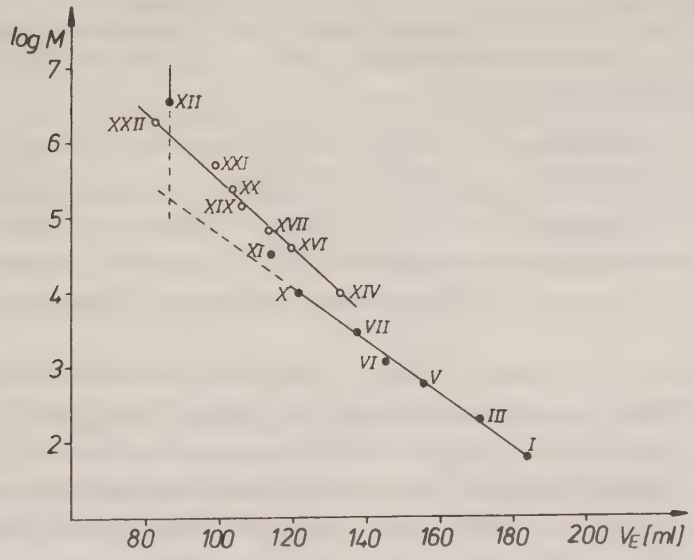


Abb.14:

Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für ein heterogen-vernetztes Polyacrylamidgel (Ansatz 131, Tab.5).
Volumenanteil an Methanol im Verdünnungsmittelgemisch aus Wasser und Methanol: 200 ml; Testsubstanzen (Substanz Nr. siehe Tab.3):
- ● - ● - Oligo- und Polyethylenglykole
- o - o - Dextrane

daher bei gleichem Molekulargewicht weniger leicht in das Gel eindringen.

Bei einem Versuch wurde statt Methanol n-Propanol im Verdünnungsmittelgemisch verwendet. n-Propanol besitzt ein schlechteres Solvatationsvermögen für das Copolymere aus Acrylamid und N,N´-Methylenbisacrylamid. Dies führt im Verlauf der Polymerisation eher zu einer Phasentrennung. Außerdem erlaubt n-Propanol auf Grund seines höheren Siedepunktes eine weitere Erhöhung der Polymerisationstemperatur, was einen vollständigen Verbrauch der Monomeren, insbesondere des Vernetzers, garantiert. In Tabelle 6 werden zwei Gele verglichen, bei deren Herstellung nur die Art des Fällungsmittels verändert wurde.

Tabelle 6:

Einfluß der Art des Fällungsmittels auf das Ausschlußmolekulargewicht von mit N,N´-Methylenbisacrylamid heterogen-vernetzten Polyacrylamidgelen. Monomermischung: 62,5 g ; Vernetzergehalt: 20 Gew.-% der Gesamtmonomerkonzentration; Verdünnungsmittelgemisch: 150 ml ; Anteil des Fällungsmittels im Verdünnungsmittelgemisch: 0,33 .

Ansatz Nr.	Art des Fällungsmittels	V_{sch} (ml/g)	V_G (ml/g)	B	M_{lim}
116	Methanol	1,35	6,6	4,89	80000
127	n-Propanol	1,60	5,3	3,31	250000

Das unter Zusatz von n-Propanol erhaltene Copolymerisat bestand aus runden, opak aussehenden Perlen, die stark verklebt waren. Die Tabelle 6 zeigt, daß die Verwendung von n-Propanol als Fällungsmittel bei der Copolymerisation Vorteile im Hinblick auf die weitere Erhöhung des Ausschlußmolekulargewichts hat. Dies ist auf eine schlechtere Solvatation des Copolymeren und auf eine frühere Phasentrennung, die zur Ausbildung der makroporösen Matrix führt, zurückzuführen.

Um die Reproduzierbarkeit der Copolymerisate zu überprüfen, wurde der Ansatz Nr. 118 (siehe Tab.5) unter gleichen Polymerisationsbedingungen wiederholt. Die beiden erhaltenen Gele besaßen das gleiche Ausschlußmolekulargewicht. Erhöht man die Rührgeschwindigkeit und polymerisiert unter sonst gleichen Bedingungen, so findet man, daß das Ausschlußmolekulargewicht wesentlich erniedrigt wird. Die Tabelle 7 zeigt diesen Einfluß der Rührgeschwindigkeit auf M_{lim}.

Tabelle 7:

Einfluß der Rührgeschwindigkeit auf das Ausschlußmolekulargewicht der Polyacrylamidgele. Alle anderen Versuchsparameter wurden konstant gehalten.

Ansatz Nr.	Rührgeschwindigkeit (U/min)	M_{lim}
118 *)	360	$2 \cdot 10^6$
151 *)	360	$2 \cdot 10^6$
141	500	20000
150	500	30000

*) Nr. 118 vgl. Tab.5; Nr. 151 vgl. Tab.16

Zusammenfassend kann man sagen, daß durch heterogen-vernetzende Copolymerisation von Acrylamid mit N,N´-Methylenbisacrylamid und einem Zusatz von 57,2 bis 78,6 Gew.-% einer Mischung aus Methanol und Wasser mit einem Volumenanteil an Methanol von 0 bis 0,60 Polyacrylamidgele hergestellt werden können, deren Ausschlußmolekulargewichte bei konstanter Vernetzer- und Initiatorkonzentration im Bereich von 1000 bis $2 \cdot 10^6$ variiert werden können. Wird das Methanol durch n-Propanol ersetzt, so kann man die Ausschlußgrenze der Gele noch weiter erhöhen. Die Gele sind mechanisch stabil und können erfolgreich zur gelchromatographischen Trennung hydrophiler Substanzen eingesetzt werden.

7.2 Die Vernetzungskomponente

Man erhält unlösliche Polyacrylamidgele, indem man Acrylsäureamid (CH_2=CH-CO-NH_2) mit einem bifunktionellen Acrylamidderivat copolymerisiert.
In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Copolymerisation von Acrylamid mit N,N´-Methylenbisacrylamid beschrieben. Zusätzlich wurden noch zwei andere Acrylamidderivate zur Copolymerisation eingesetzt.

$CH_2=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$ N,N´-Methylenbisacrylamid

$CH_2=CH-CO-NH-CH(OH)-CH(OH)-NH-CO-CH=CH_2$ Glyoxalbisacrylamid

$CH_2=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$ N,N´-Ethylenbisacrylamid

Glyoxalbisacrylamid ist - auf Grund der OH-Gruppen - hydrophiler als N,N´-Methylenbisacrylamid. N,N´-Ethylenbisacrylamid zeigt dagegen wegen der Ethylenbrücke hydrophobere Eigenschaften. Der Einfluß solcher Änderungen des Vernetzers auf die Eigenschaften der Gele wurde untersucht.

Die Eigenschaften der mit diesen Vernetzerkomponenten hergestellten Polyacrylamidgele sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.
Glyoxalbisacrylamid löst sich in einer wäßriger Acrylamidlösung besser als N,N´-Methylenbisacrylamid. In einer 20 Gew.-%-igen wäßrigen Acrylamidlösung lösen sich 16 Gew.-% Glyoxalbisacrylamid, aber nur 8 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid, bezogen auf die Acrylamidlösung. Die Tabelle 8 zeigt, daß bei Verwendung von Glyoxalbisacrylamid als Vernetzungskomponente nur Gele mit niedrigem Ausschlußmolekulargewicht erhalten werden. Es läßt sich bereits ohne Lichtmikroskop erkennen, daß die Heterogenität dieser Copolymeren sehr niedrig ist. Die Perlen sind klar, durchsichtig, und besitzen noch Oberflächenglanz (Abb.15).

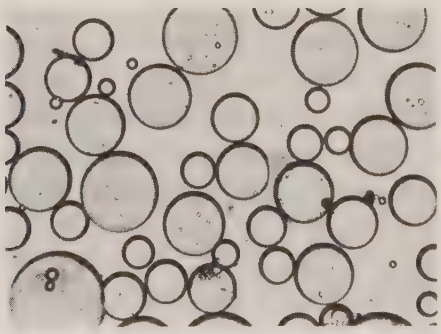


Abb.15: Lichtmikroskopische Aufnahme von in Wasser gequollenem heterogenvernetztem Polyacrylamidgel des Ansatzes 133 (Tab.8) (63-fache Vergrößerung).

Tabelle 8:

Eigenschaften heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele, die mit Glyoxalbisacrylamid bzw. N,N´-Ethylenbisacrylamid als bifunktionelle Komponenten hergestellt wurden (Polymerisationsbedingungen siehe exp. Teil, Kap.10).

Spalte (1): Ansatz Nr.
Spalte (2): Acrylamidmenge (g)
Spalte (3): Konzentration des Vernetzers (Gew.-% der Monomermischung)
Spalte (4): Art der Vernetzungskomponente
G = Glyoxalbisacrylamid
E = N,N´-Ethylenbisacrylamid
Spalte (5): Volumenanteil an Methanol im wäßrigen Verdünnungsmittelgemisch
Spalte (6): Gesamtvolumen des Verdünnungsmittelgemischs (ml)
Spalte (7): V_{sch} = spezifisches Schüttvolumen (ml/g)
Spalte (8): V_G = spezifisches Gelbettvolumen in Wasser bei 23°C (ml/g)
Spalte (9): B = Volumenquellung
Spalte (10): M_{lim} = Ausschlußmolekulargewicht

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
138	50	20,0	G	0	150	1,5	4,00	2,67	1500
136	50	16,7	G	0,33	150	1,5	4,70	3,13	1500
133	50	20,0	G	0,33	150	1,5	4,45	2,97	2500
135	50	23,1	G	0,25	200	1,4	5,00	3,57	3000
140	50	44,4	G	0,40	200	1,6	3,00	1,88	1500
143[a)]	50	23,1	G	0,66[b)]	200	—	—	—	—
145	16	20,0	E	0,32	64	1,9	10,90	5,74	6000

a) keine Perlen, unregelmäßig geformte Partikel

b) DMSO statt Methanol

Verschiedene Versuchsbedingungen bei der Herstellung solcher Gele zeigen, daß die Erhöhung sowohl der Vernetzerkonzentration als auch der Fällungsmittelkonzentration im Verdünnungsmittelgemisch keinen wesentlichen Einfluß auf das Ausschlußmolekulargewicht der Gele hat (z.B. vgl. Gel 136 mit 133 und Gel 138 mit 133, Tab.8).

Durch die Hydrophilie dieser Vernetzungskomponente kann man die geringe Heterogenität dieser Gele erklären. Wasser / Methanol ist für das sich bildende Copolymere ein gutes Lösungsmittel. Dies führt im Verlauf der Polymerisation zu einer

späteren Phasentrennung; dadurch wird die Heterogenität der Netzwerkstruktur und damit das Ausschlußmolekulargewicht dieser Gele geringer.
Das Methanol im Verdünnungsmittelgemisch wurde bei einem Versuch durch Dimethylsulfoxid ersetzt (Gel 143, Tab.8). Damit sollte eine frühere Entmischung in den Polymerpartikeln auf Grund des schlechteren Solvatationsvermögens dieser Inertkomponente erzielt werden. Bei diesem Ansatz entstanden keine Perlen, sondern eine weiße koagulierte Masse, die im trockenen Zustand gummiartig ist. Dieses Copolymerisat ließ sich nicht zerkleinern, so daß es unmöglich war, eine Säule mit diesem Gel zu füllen. Eine Erklärung, weshalb bei dieser Copolymerisation keine Perlen erhalten wurden, liegt möglicherweise darin, daß Dimethylsulfoxid die Wirkung des Schutzkolloids zurückdrängt.

Das Schutzkolloid, ein Copolymer aus Maleinsäureanhydrid und Octadecen, wird durch Zusatz von Natronlauge partiell hydrolysiert, so daß die Hälfte der Carboxylgruppen als Natriumsalz vorliegt. Das so modifizierte Schutzkolloid übt an der Grenzfläche zwischen der organischen und wäßrigen Phase seine Wirkung als oberflächenaktives Suspendiermittel aus. Dimethylsulfoxid kann keine Wasserstoffbrücken bilden und deshalb das Anion nur schlecht solvatisieren. Dimethylsulfoxid besitzt größere Affinität zu dem hydrophoben Rest des Schutzkolloids. Das Zusammentreffen der polymerisierenden Tröpfchen wird daher nicht verhindert.

Die Auftragung der Elutionsvolumina der Testsubstanzen, die an einigen mit Glyoxalbisacrylamid hergestellten Polyacrylamidgelen getrennt wurden, gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts ist in Abbildung 16 wiedergegeben.
Die Darstellung und Homopolymerisation von N,N´-Ethylenbisacrylamid wird in der Literatur beschrieben[24, 25]. In dieser Arbeit wurde das Monomere als Vernetzer bei der Copolymerisation mit Acrylamid verwendet. Durch die Ethylenbrücke des Monomeren wird das Copolymere hydrophober. Damit sollte die Hydrophilie des gebildeten Copolymeren erniedrigt werden, um die Phasentrennung früher oder zusammen mit dem Gelpunkt zu erreichen. Die Copolymerisation bei diesem Versuch verlief langsamer als bei anderen vergleichbaren Perlcopolymerisationen.
Das erhaltene Gel besteht aus sehr kleinen, runden, klaren Perlen, die im Wasser stark quellen (siehe Tab.8). Da relativ wenig Material vorhanden war, wurden die chromatographischen Trennungen in einer Säule mit einem Volumen von nur 21 ml durchgeführt. Man erhält bei diesem Gel ein höheres Ausschlußmolekulargewicht als

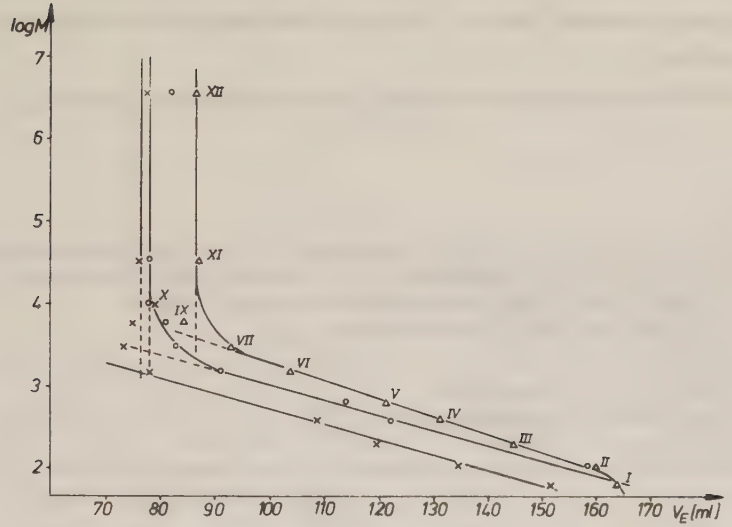


Abb.16:

Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für einige mit Glyoxalbisacrylamid hergestellte heterogenvernetzte Polyacrylamidgele.
Säulendimensionen: 100 x 1,5 cm; V_T = 177 ml; Druck: 2 bar; Durchflußgeschwindigkeit: 36 ml/h; Testsubstanzen (Substanz-Nr. siehe Tab.3): Polyethylenglykole.
o - o Ansatz 133, Tab.8
Δ - Δ Ansatz 135, Tab.8
x - x Ansatz 140, Tab.8

bei den unter gleichen Bedingungen mit Glyoxalbisacrylamid vernetzten Polyacrylamidgelen. Weitere Untersuchungen mit N,N´-Ethylenbisacrylamid als Vernetzer wurden nicht durchgeführt, so daß keine weiteren Schlüsse auf das Verhalten der Copolymerisate und ihre Anwendung für chromatographische Zwecke möglich sind.

7.3 Die Konzentration der Vernetzungskomponente

Die Heterogenität eines durch die vernetzende Copolymerisation in Gegenwart von Verdünnungsmitteln gebildeten Polymeren wächst mit steigender Konzentration der Vernetzungskomponente. Ein hoher Vernetzergehalt führt im Anfangsstadium der Copolymerisation zu einer verstärkten intramolekularen Vernetzung; dadurch wird

die Bildung höher vernetzter Zentren, die eine Voraussetzung für die Makroporosität ist, gefördert.

In Tabelle 9 sind die entsprechenden Versuche und ihre Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 9:

Einfluß der Konzentration der Vernetzungskomponente auf das Ausschlußmolekulargewicht von vernetzten Polyacrylamidgelen, die in Gegenwart eines aus Methanol/Wasser bestehenden Verdünnungsmittelgemisches hergestellt wurden.
Volumenanteil an Methanol in der Inertkomponente: 0,4

Ansatz Nr.	Vernetzerkonzentration (Gew.-%)	Monomere/ Inertkomponente	V_{sch} (ml/g)	V_G (ml/g)	B	M_{lim}
142	10	1 : 2,74	1,40	7,80	5,57	5000
144	15	1 : 2,93	1,70	7,40	4,35	6000
118	20	1 : 2,93	1,90	8,25	4,34	$2 \cdot 10^6$
146	25	1 : 2,75	1,45	7,30	5,03	250000
147	30	1 : 2,57	2,00	6,00	3,00	$1 \cdot 10^6$
148	35	1 : 2,93	2,50	6,00	2,40	500000

Die Copolymerisationen erfolgten unter Zusatz von Methanol zum Verdünnungsmittelgemisch. Mit Erreichen von 20 Gew.-% Vernetzeranteil steigt der Anteil permanenter Poren an. Die mit Vernetzergehalten von mehr als 15 Gew.-% erhaltenen Perlen zeigen im gequollenen und ungequollenen Zustand keine Transparenz, sie sind opak und weiß. Bei höherem Vernetzeranteil (> 20 Gew.-% bezogen auf die Monomermischung) nimmt die Porengröße wieder ab (Abb.17). Allerdings tritt in der Nähe eines solchen Maximums eine größere Fehlerbreite in der erzielbaren Heterogenität des Gels auf [28]. Dies liegt im wesentlichen an der Schwierigkeit, den Temperaturverlauf der Polymerisation exakt zu reproduzieren.

Als Beispiel der Trenneigenschaften solcher Gele sind in den Abbildungen 18 bis 20 Elutionsdiagramme und die Eichkurve des Gels 146 angegeben. Wie schon in Kapitel 7.1 erwähnt wurde, werden die Dextrane später als die Polyethylenglykole gleicher Molekulargewichte eluiert (Abb.20).

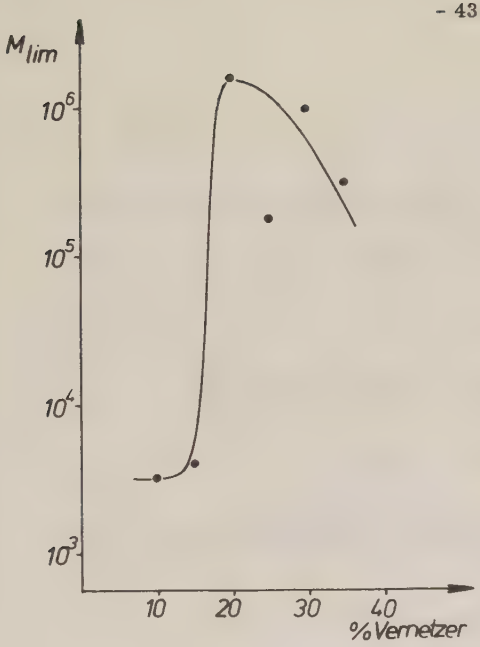


Abb.17:

Abhängigkeit des Ausschlußmolekulargewichts M_{lim} von der Konzentration der Vernetzungskomponente N,N´-Methylenbisacrylamid bei den in Gegenwart von Wasser/Methanol (40 Vol.-% Methanol in der Inertkomponente) heterogen-vernetzten Copolymeren des Acrylamids.

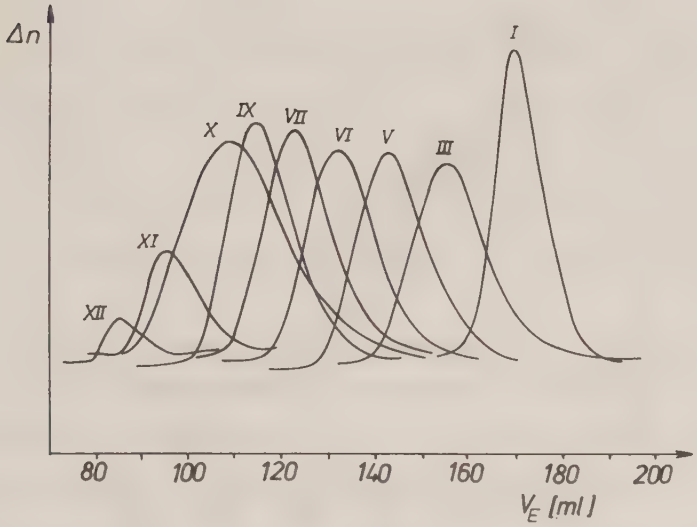


Abb.18:

Superposition der Elutionsdiagramme der Oligo- und Polyethylenglykole (Testsubstanz Nr. siehe Tab.3) getrennt an einem mit 25 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 146, Tab.9); es wurden jeweils 0,2 ml einer 10 %-igen wäßrigen Lösung auf die Säule gegeben (Probe Nr. XII nur 1 %-ige wäßrige Lösung).

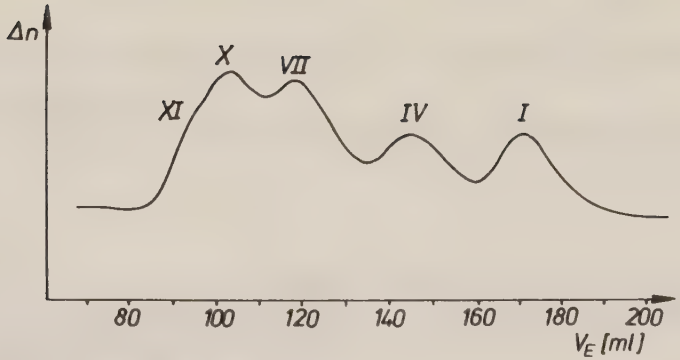


Abb.19:

Elutionsdiagramm eines Gemisches aus Oligo- und Polyethylenglykolen getrennt an einem heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 146, Tab.9); Vernetzergehalt: 25 Gew.-% .

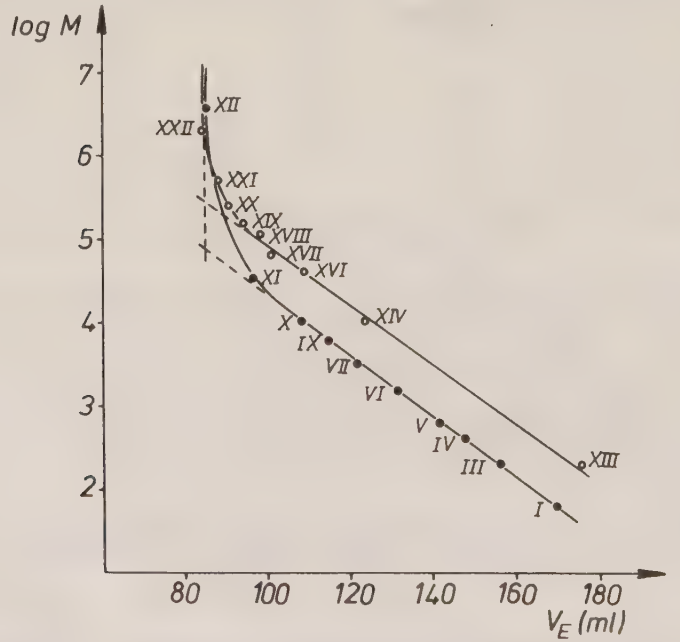


Abb.20:

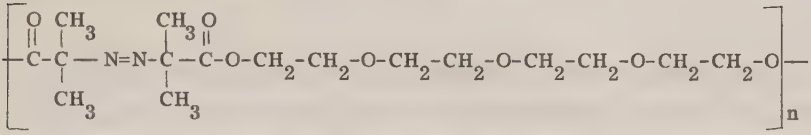
Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E vom Logarithmus des Molekulargewichts M in Wasser bei 23°C für ein mit 25 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid hergestelltes heterogen-vernetztes Polyacrylamidgel (Ansatz 146, Tab.9).
Säulendimension: 100 x 1,5 cm; V_T = 177 ml; Druck: 2 bar; Durchflußgeschwindigkeit: 36 ml/h; Testsubstanzen (Substanz Nr. siehe Tab.3):

● - ● Oligo- und Polyethylenglykole
○ - ○ Dextrane

7.4 Der Initiator

Für die Copolymerisationsversuche wurde Ammoniumperoxodisulfat als Initiator benutzt. Nur in einem Fall kam ein Präpolymeres *) aus Acrylamid, das noch einige Azogruppen enthält, als Initiator zum Einsatz. Dadurch schließt man die Anwesenheit von Sulfatgruppen an den Polymerketten aus. Diese Endgruppen können Störungen bei der Proteintrennung hervorrufen.

W.Heitz und R.Walz [26] untersuchten Polymerisationen mit Polyazoestern, die sie aus verschiedenen Polyethylenglykolen und AIBN darstellten. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete polymere Azoinitiator ist das Kondensationsprodukt aus Tetraethylenglykol und AIBN und hat die Formel:



Durch partielle Zersetzung der Azogruppen in Gegenwart von Acrylamid entsteht ein wasserlösliches Präpolymeres mit einem Molekulargewicht von ca. 10000.
Bei der Perlcopolymerisation wurde nur Wasser als Verdünnungsmittel eingesetzt, da eine höhere Reaktionstemperatur notwendig ist, um die Zersetzung des Azoinitiators zu erzielen. Bei der Polymerisation wurde rasch von Zimmertemperatur auf 60°C und dann in 1 h von 60 auf 73°C erwärmt und 4 h bei dieser Temperatur gehalten. Zur vollständigen Zersetzung des Polyinitiators wurde noch 2 h auf 80°C erhitzt.

Die erhaltenen Perlen erscheinen unter dem Lichtmikroskop als klare, runde, durchsichtige Teilchen. Im gequollenen Zustand besitzen sie Oberflächenglanz.

In Tabelle 10 werden die Eigenschaften eines mit Ammoniumperoxodisulfat und eines mit dem Präpolymeren hergestellten Polyacrylamidgels verglichen.

---

*) Ich danke Herrn Dehmel für die Überlassung des Initiators.

Tabelle 10:

Einfluß der Art des Initiators auf die Eignnschaften von homogen-vernetzten Polyacrylamidgelen, die in Gegenwart von Wasser als Verdünnungsmittel hergestellt wurden.
Vernetzungskomponente: N,N´-Methylenbisacrylamid (20 Gew.-% der Monomermischung); Verhältnis Monomerenanteil / Wasser = 1 : 1,60 .

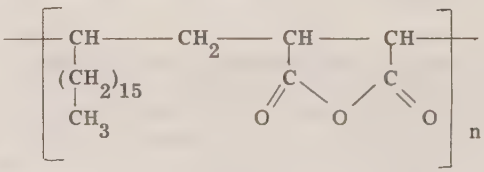
Ansatz Nr.	Initiator	Reaktionstemperatur (^{o}C)	V_{sch} (ml/g)	V_{G} (ml/g)	M_{lim}
101	Ammoniumperoxodisulfat	40-50	1,25	3,45	800
126	Präpolymer	70-80	1,40	6,25	3000

Um heterogen-vernetzte Polyacrylamidgele mit dem Präpolymeren als Initiator zu erzeugen, muß man im Verdünnungsmittelgemisch Substanzen einsetzen, deren Siedepunkte höher als 80^{o}C sind. Wenn man jedoch mit Ammoniumperoxodisulfat als Initiator arbeitet, kann man bereits bei Temperaturen unter 50^{o}C polymerisieren.

7.5 Das Schutzkolloid

Mit hohen Fällungsmittelkonzentrationen im Verdünnungsmittelgemisch oder hohen Vernetzergehalten erhält man Copolymerisate, die teilweise aus zusammengeklebten Perlen bestehen. Die Aufarbeitung der Gele wird dadurch erschwert. Durch Modifizierung des Schutzkolloids sollte versucht werden, das Verkleben der Perlen zu vermeiden.

Die Anhydridgruppe des verwendeten Schutzkolloids, ein Copolymeres aus Maleinsäureanhydrid und Octadecen der Formel



wurde bei der Copolymerisation durch Zusatz von Natronlauge zu 50 % in das Natriumsalz überführt. Hierdurch wird das Schutzkolloid hydrophiler und die Monomerphase besser stabilisiert.

Um den hydrophilen bzw. hydrophoben Charakter des Schutzkolloids zu verstärken, wurde mit Diethylenglykolmonoethylether bzw. Cetylalkohol verestert.
Die hydrophile Gruppe wurde in das Schutzkolloid eingebaut durch Veresterung der Anhydridgruppen mit Diethylenglykolmonoethylether bis zum Halbester. Copolymerisationsversuche in Anwesenheit dieses Schutzkolloids führten jedoch nicht zu kugeligen Polymerpartikeln, sondern das Copolymerisat bestand aus zusammengeklebten unregelmäßigen Teilchen, die für chromatographische Trennungen nicht geeignet waren.

Der hydrophobe Rest wurde in das Schutzkolloid durch Veresterung mit Cetylalkohol eingeführt. Auch hier wurde der Halbester erzeugt. Das so modifizierte Schutzkolloid ist bei der Perlcopolymerisation wirkungslos. Das damit erhaltene Gel bestand nur aus groben zusammengeklebten Flocken.

Daraus kann man schließen, daß die Wirksamkeit des Schutzkolloids durch die Einführung von aliphatischen Gruppen nicht verbessert wird.
Überführt man die Anhydridgruppe des Schutzkolloids durch Zusatz von Natronlauge zu 100 % in das Natriumsalz und führt damit eine Copolymerisation durch, so erhält man ein Copolymerisat, das aus runden Perlen besteht, jedoch ist ein großer Teil der Perlen zusammengeklebt.

8. Gelchromatographische Trennung von Proteinen an Polyacrylamidgelen

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, hydrophile Gele zu entwickeln, die besonders für die gelchromatographische Proteintrennung geeignet sind. Die Gele sollen außerdem mechanisch- und biostabil sein, sowie beim Trennvorgang keine Adsorptionserscheinungen zeigen.

Proteine werden meistens zur Standardisierung von im Wasser quellbaren Gelen herangezogen, da sie mit einem genau definierten Molekulargewicht schon in der Natur vorkommen. Man kennt bei den globulären Proteinen außer dem Molekulargewicht meist auch die Abmessungen. Daher kann man mit Hilfe einer durch Proteine geeichten Säule oft auch Aufschluß über den Wirkungsradius von anderen Makromolekülen erhalten. Wegen ihrer Wirkung beanspruchen naturgemäß die Enzyme das besondere Interesse des Proteinchemikers. Ständig werden neue Stoffwechselreaktionen entdeckt und die diese katalysierenden Enzyme angereichert und isoliert. Man kann mit Hilfe der Gelchromatographie auch von noch unreinen Enzympräparaten oder beim Vorliegen besonders kleiner Mengen an Enzymproteinen das Molekulargewicht bestimmen. Die gelchromatographische Methode ist einfach und erfordert nur einen geringen experimentellen Aufwand.

Zwei Gele mit verschiedenen Ausschlußmolekulargewichten wurden mit Proteinen als Testsubstanzen geeicht (Ansatz 149, Tab.16; Ansatz 147, Tab.9). Die Herstellung der Gele sowie die Füllung der Säulen erfolgte wie in Kapitel 10.5 beschrieben wird. Anstelle des Wassers wurde eine 0,05 m Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Pufferlösung (pH = 7,5) verwendet. Sie enthielt einen Zusatz von 0,02 % Natriumazid zur Verhinderung von Bakterienwachstum. Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt. Angezeigt wurden die Proteine im Eluat durch UV-Absorption bei 280 nm *). Die verwendeten Testproteine sind in Tabelle 12 aufgeführt.

---

*) UVICORD II LKB 8 300 A der Firma LKB, Schweden

Tabelle 12:

Testproteine, die zur gelchromatographischen Untersuchung heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele verwendet wurde.

Nr.	Protein bzw. Aminosäure	M	log M	Proteinlösung a) (%)	(ml)
XXIII	Phenylalanin b)	165,2	2,218	0,2	0,6
XXIV	N-Hippuryl-L-phenylalanin c)	326	2,513	0,2	0,7
XXV	Glucagon d)	3500	3,544	0,5	0,6
XXVI	Ribonuclease b)	13600	4,134	0,6	0,6
XXVII	Hämoglobin (Rind) b)	68000	4,832	0,2	0,6
XXVIII	Ferritin (Pferd) d)	480000	5,681	0,2	0,6
XXIX	Glutamatdehydrogenase c)	10^6	6,00	0,4	0,6

a) Konzentration (Gew.-%) und Menge (ml) der auf die Säule gegebenen Proteinlösung

Bezugsquellen:

b) Firma Merck, Darmstadt
c) Firma Schuchardt, München
d) Firma Serva-Feinchemikalien, Heidelberg

Abbildung 21 zeigt als Beispiel die Auftragung der Elutionsvolumina V_E der Testproteine in Abhängigkeit vom Logarithmus des Molekulargewichts M. Die getesteten Gele zeigten bei der Trennung von Dextranen Ausschlußmolekulargewichte von 300000 für Gel 149 und $1 \cdot 10^6$ für Gel 147. Bei der Proteintrennung liegt das Ausschlußmolekulargewicht des Gels 149 bei ca. 500000 und das des Gels 147 bei 300000. Beide Gele zeigen Kurven mit einem linearen Bereich, der sich über den Molekulargewichtsbereich von 165 bis zum Ausschlußmolekulargewicht erstreckt. Die Gele des Ansatzes 149 und 147 unterscheiden sich nur in der Konzentration des Vernetzers (20 resp. 30 Gew.-% der Monomermischung). Bei dem Gel mit höherem Vernetzergehalt beobachtet man, daß das Innenvolumen V_I, das für die Trennung zur Verfügung steht, kleiner wird. Die Aminosäure Phenylalanin wird mit einem Volumen $> V_T$ eluiert (siehe Abb.21). Von V_T sind ca. 25 ml für die Gelmatrix abzuziehen, d.h., bei allen Proteinen mit $V_E > 160$ ml kann man auf verstärkte Wechselwirkung schließen; trotzdem ist die Kurve insgesamt linear.

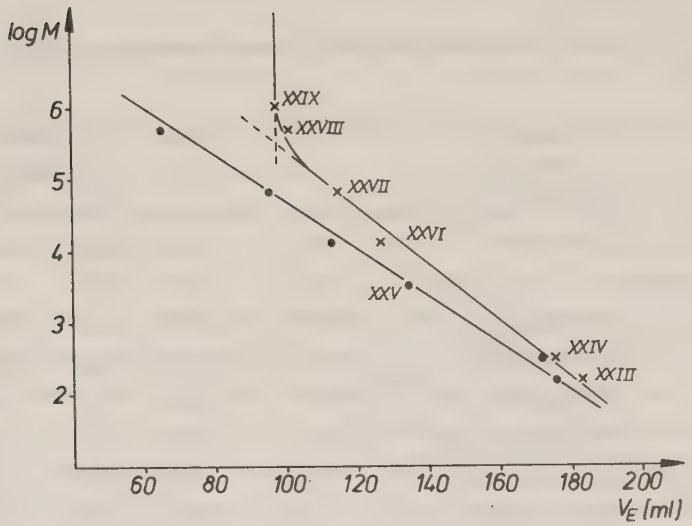


Abb. 21:

Abhängigkeit der Elutionsvolumina V_E der in Tabelle 12 angegebenen Testproteine vom Logarithmus ihres Molekulargewichts M in Tris-Puffer bei 23°C für zwei heterogen-vernetzte Polyacrylamidgele.
Chromatographiesäule: 100 x 1,5 cm; V_T = 177 ml; Druck: 2 bar; Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h.
- ● - ● - Ansatz Nr. 149, Tab.16
- x - x - Ansatz Nr. 147, Tab.9

Sun und Sehon[11] haben festgestellt, daß bei Polyacrylamidgelen die Netzwerkstruktur des Gels eine entscheidende Rolle für die Affinität zu Aromaten spielt. Die Polyacrylamidgele retardieren gewisse aromatische Verbindungen (Tryptophan wurde bei einem stärker quellbaren Polyacrylamidgel stärker retardiert als bei einem dichteren Typ). Es ist noch ungeklärt, wie eine Wechselwirkung zwischen den in Wasser gequollenen Gelen und aromatischen Verbindungen zustandekommt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Polyacrylamidgele zur gelchromatographischen Proteintrennung geeignet sind. Die Auftragung der Elutionsvolumina gegen den Logarithmus des Molekulargewichts ist in weiten Molekulargewichtsbereichen linear, so daß eine Molekulargewichtsbestimmung unbekannter Proteine möglich ist. Mikrobenbefall und Verringerung der Durchflußgeschwindigkeit war während des Betriebs über einen Zeitraum von vier Wochen nicht festzustellen.

Bei Gelen, die zur Trennung von Proteinen verwendet werden, ist es erwünscht, daß der Quellungsgrad durch Veränderung der Ionenstärke nur wenig beeinflußt wird. Wenn das nicht der Fall ist, muß man bei jedem Puffer den Quellungsgrad der Gele berücksichtigen; ein Pufferwechsel in der gepackten Säule wäre dann unmöglich.

Es wurde der Quellungsgrad in Wasser sowie in alkoholischen und salz altigen Lösungen des im Handel erhältlichen Polyacrylamidgels *) (Biogel P-200) mit den in dieser Arbeit hergestellten Polyacrylamidgelen verglichen. Die spezifischen Schütt- und Gelbettvolumina der Gele wurden wie in Kapitel 5.1 beschrieben bestimmt. Daraus wurde die Volumenquellung B berechnet.
In Tabelle 13 sind die Quellversuche zweier Polyacrylamidgele (Ansatz 128 und Ansatz 137, Tab.5) und des Biogels P-200 zusammengefaßt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 wiedergegeben.

Aus den Ergebnissen sieht man, daß die hergestellten Polyacrylamidgele keine Änderung im Quellungsgrad zeigen, wenn sie in Lösungen mit verschiedenen Elektrolytgehalten bzw. Methanolgehalten gequollen werden. Das Biogel P-200 zeigt dagegen in diesen Lösungen große Unterschiede in der Quellung. Auf Grund dieser Eigenschaften bieten die hier hergestellten Polyacrylamidgele erhebliche Vorteile gegenüber dem Biogel.

---

*) Hersteller: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.(USA)

Tabelle 13:

Quellversuche in Wasser, Kochsalzlösungen und Methanol/Wasser-Gemischen von heterogen-vernetzten Polyacrylamidgelen (Ansatz 128 und 137, Tab.5) sowie Biogel P-200 .

Gel		NaCl-Gehalt (Gew.-%)					
		0	2	4	7	10	15
Biogel P-200 M_{lim} = 300000	V_{sch} (ml/g)	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48
	V_G (ml/g)	23,6	28,0	28,8	30,2	33,2	34,5
	B	16,8	18,9	19,4	20,4	22,5	23,1
Gel 128 M_{lim} = 500000	V_{sch} (ml/g)	3,48	3,48	3,48	3,48	3,48	3,48
	V_G (ml/g)	7,8	7,9	8,1	—	8,1	7,9
	B	2,2	2,3	2,3	—	2,3	2,3
Gel 137 M_{lim} = 40000	V_{sch} (ml/g)	2,12	2,12	—	2,12	—	2,12
	V_G (ml/g)	7,6	7,4	—	7,3	—	7,4
	B	3,6	3,5	—	3,4	—	3,5

Gel		MeOH-Gehalt (Vol-%)				
		0	2	5	10	15
Biogel P-200 M_{lim} = 300000	V_{sch} (ml/g)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	V_G (ml/g)	24,0	22,5	22,5	20,0	18,0
	B	15,0	14,1	14,1	12,5	11,25
Gel 128 M_{lim} = 500000	V_{sch} (ml/g)	2,8	3,0	3,2	3,2	2,8
	V_G (ml/g)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,1
	B	2,7	2,4	2,3	2,3	2,5
Gel 137 M_{lim} = 40000	V_{sch} (ml/g)	2,3	2,6	2,2	2,3	2,2
	V_G (ml/g)	7,6	7,6	7,0	7,6	7,2
	B	3,3	2,9	3,2	3,3	3,4

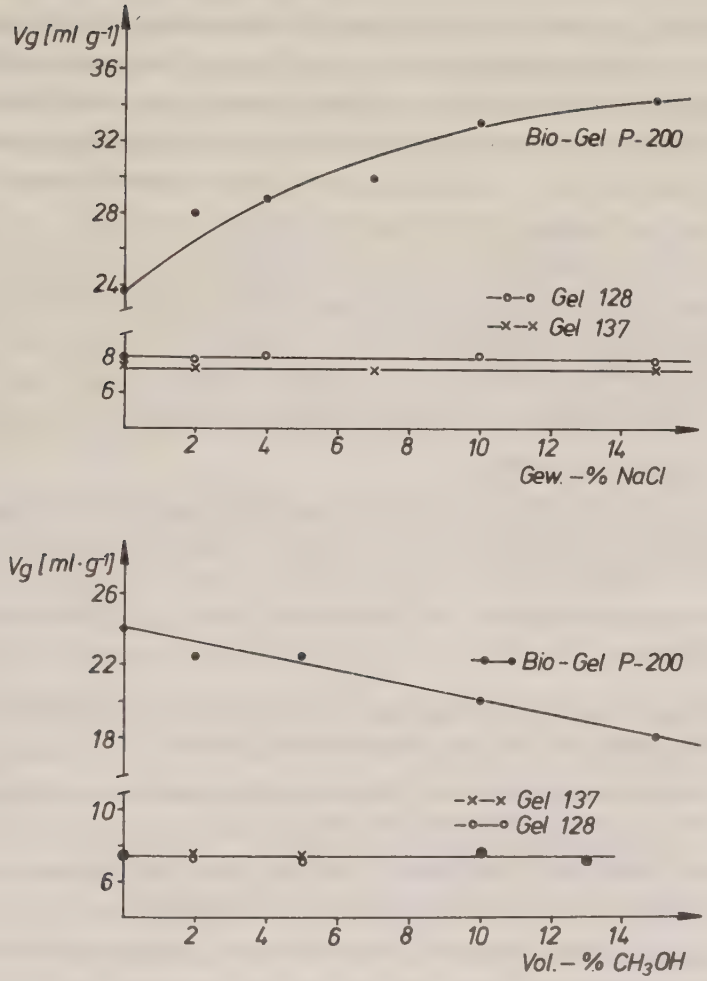


Abb. 22:

Abhängigkeit des spezifischen Gelbettvolumens V_G von der Zusammensetzung des Quellungsmittels für heterogen-vernetzte Polyacrylamidgele (Ansatz 128 und 137, Tab. 5) und für Biogel P-200 .

9. Mechanische Stabilität der Polyacrylamidgele

Für die chromatographische Anwendung einer stationären Phase ist die Kenntnis ihrer mechanischen Stabilität besonders wichtig. Um heterogen-vernetzte, mechanisch stabile Gele zu erhalten, darf bei der Herstellung die Phasentrennung nicht weit vor Erreichen des Gelpunktes eintreten, da sonst spröde und brüchige Polymerpartikel erhalten werden; in der Säule entsteht dann durch Abrieb feindisperses Material, was zur Verstopfung der Chromatographiesäule führen kann. Die Gele dürfen auch nicht zu schwach vernetzt sein, da sie sich sonst leicht deformieren lassen. Unter dem Lösungsmitteldruck werden die Polymerpartikel verformt, was den Lösungsmittelfluß beträchtlich verlangsamt und ebenfalls zur Verstopfung der Säule führen kann. Die Verformung solcher Gelperlen ist irreversibel, man darf daher beim Packen solcher Säulen bereits beim Füllvorgang nur unter geringem hydrostatischem Druck arbeiten.

Für mechanisch stabile Gele gilt, daß die Durchflußgeschwindigkeit in der Gelchromatographiesäule direkt proportional dem Druck ist, der über dem Gelbett herrscht[27)]

$$U = K \cdot \Delta p/L \qquad (5)$$

$$K = K_o/\eta \qquad (6)$$

U = lineare Durchflußgeschwindigkeit, ausgedrückt in cm/h ($ml/cm^2 \cdot h$)
Δp = der Druck, der über dem Gelbett herrscht (in bar)
L = Höhe des Gelbetts (in cm)
K = Proportionalitätskonstante, die von den Eigenschaften des Gelbettmaterials und dem Elutionsmittel abhängt
η = Viskosität des Lösungsmittels (in cp)
K_o = die "spezifische Permeabilität", die nur noch von der Pertikelgröße des Gelbetts und dem spezifischen Gelbettvolumen abhängt

Für ein Lösungsmittel der Viskosität = 1 cp (Wasser = 1,08 cp bei 20^oC) gilt:

$$U = K_o \cdot \frac{\Delta p}{L} \qquad (7)$$

Aus Gleichung (7) folgt, daß die Durchflußgeschwindigkeit direkt proportional ist dem Druck oberhalb des Gelbetts und umgekehrt proportional der Gelbetthöhe. Maximale Durchflußgeschwindigkeiten erfordern maximale Arbeitsdrücke. Die Durchflußgeschwindigkeiten sind in guter Näherung vom Säulendurchmesser abhängig. Wenn

die Viskosität vom Lösungsmittel ungleich 1 cp ist, können die Durchflußgeschwindigkeiten unter Benutzung der Beziehung (5) berechnet werden, wobei die Durchflußgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Viskosität ist. Hohe Viskositäten des Elutionsmittels führen zu geringeren Durchflußgeschwindigkeiten. Um den Viskositätseffekt zu kompensieren, kann der Arbeitsdruck jedoch erhöht werden. Die Temperatur beeinflußt die Viskosität des Elutionsmittels; daher sind die Durchflußgeschwindigkeiten ebenfalls temperaturabhängig.

Bei weichen, stark gequollenen Gelen sind die Berechnungen der Durchflußgeschwindigkeiten komplizierter; Gleichung (5) ist nicht mehr anwendbar. Die Durchflußgeschwindigkeit ist dann nicht nur von den schon erwähnten Faktoren abhängig, sondern auch vom Säulendurchmesser. Bei diesen Gelen muß man in einem Druckbereich arbeiten, der sich im linearen Teil der Kurve - Durchflußgeschwindigkeit vs. Druck - befindet.

Im Bereich linearer Abhängigkeit zwischen dem Arbeitsdruck und der Durchflußgeschwindigkeit ist ein Gel als mechanisch stabil anzusehen. In Abbildung 23 ist die Durchflußmenge pro Zeit und Durchmesser der Säule in Abhängigkeit des Druckes, der auf dem Gelbett lastet, für ein heterogen-vernetztes Polyacrylamidgel (Ansatz 141, Tab.16) aufgetragen. Die Säulen wurden bei verschiedenen Drücken gefüllt.

Die Partikelgröße des getesteten Gels lag zwischen 33 und 88 µ. Die Säule von 100 cm Länge und 1,2 cm Durchmesser hatte ein Volumen von 110 ml. Das Gel gehorcht der Beziehung (5) bis zu einem bestimmten Druck, der vom Fülldruck der Säule abhängt. Die Durchflußmenge nimmt zunächst linear mit dem Druck zu und bleibt dann trotz weiterer Erhöhung des Druckes nahezu konstant. Wahrscheinlich werden in diesem Bereich die Gelperlen unter dem steigenden Lösungsmitteldruck deformiert; dies führt zu einer Verengung der Kanäle zwischen den Gelpartikeln, so daß die Durchflußmenge nicht mehr ansteigt. Bei diesem getesteten Gel wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 235 $ml/cm^2 \cdot h$ bei einem Druck von 6,2 bar erreicht.

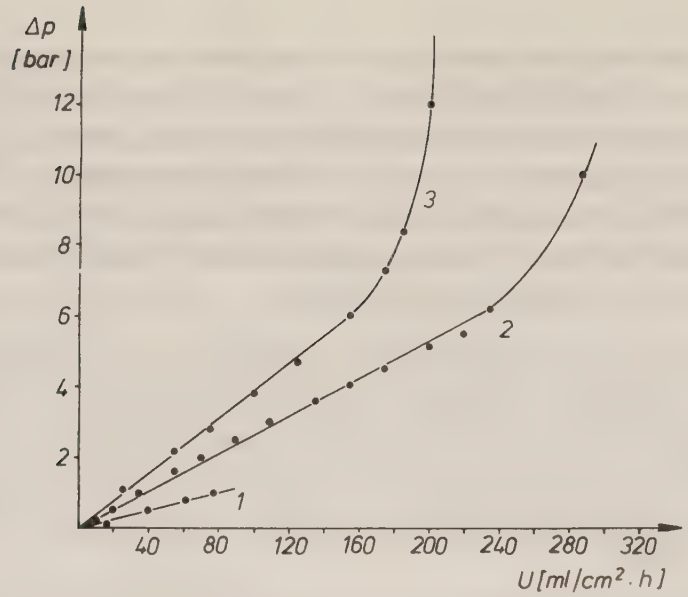


Abb.23:

Abhängigkeit der Durchflußgeschwindigkeit U (ml/cm^2·h) vom Druck Δp (bar), der über dem Gelbett (100 x 1,2 cm) herrscht, für ein heterogen-vernetztes Polyacrylamidgel (Ansatz 141, Tab.16).
Partikelgröße: zwischen 33 und 88 µ ; Fülldruck: Kurve 1 = 1,5 bar, Kurve 2 = 6,0 bar, Kurve 3 = 11,5 bar.

Auch die Zahl der theoretischen Böden n des Gels wurde bei verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten ermittelt. Die aus der Anzahl der Böden berechnete Bodenhöhe gibt einen Eindruck von der Trennleistung einer gelchromatographischen Säule. Die Bodenhöhe wird u.a. durch die Strömungsgeschwindigkeit beeinflußt, da bei einer geringeren Trennungsgeschwindigkeit die Einstellung des Diffusionsgleichgewichts der zu trennenden Substanzen zwischen der mobilen und stationären Phase vollständiger ist.

In Abbildung 24 sind die Messungen der theoretischen Bodenhöhe bei verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten des Gels 141 (Tab.16) dargestellt. Die theoretische Bodenzahl wurde jeweils aus dem Elutionspeak des Methanols bestimmt.

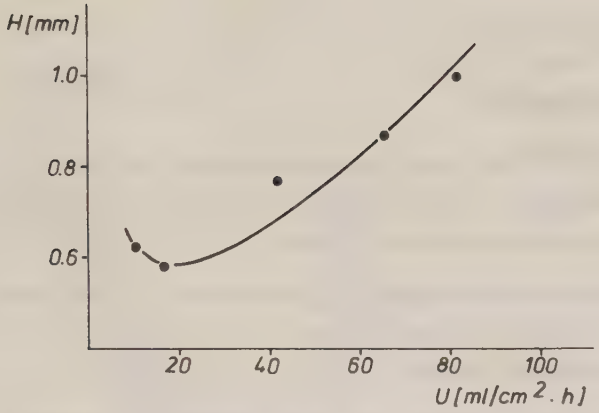


Abb.24:

Abhängigkeit der theoretischen Bodenhöhe H (mm) von der Durchflußgeschwindigkeit U (ml/cm^2. h) gemessen an einem heterogen-vernetzten Polyacrylamidgel (Ansatz 141, Tab.16).
Partikelgröße: zwischen 33 und 88 µ ; Säulenlänge: 100 cm ; Testsubstanz: Methanol (M = 32,04).

Wie erwartet kommt es mit steigenden Strömungsgeschwindigkeiten zur Verbreiterung der Banden bzw. zu zunehmenden Bodenhöhen. Bei extrem langsamer Elutionsgeschwindigkeit tritt durch die Longitudinaldiffusion wiederum eine Vergrößerung der theoretischen Bodenhöhe ein. Dazwischen gibt es eine optimale Strömungsgeschwindigkeit, die sich aus dem Minimum der Hyperbel der Abbildung 24 ermitteln läßt.

10. Experimenteller Teil

10.1 Reinigung der Reagenzien

Dimethylsulfoxid wurde im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre destilliert. Das für die Darstellung von N,N´-Ethylenbisacrylamid verwendete Benzol wurde über Na/K-Legierung und unter Stickstoff destilliert.

Acrylsäurechlorid wurde über Hydrochinon als Stabilisator bei 72°C destilliert. Die Destillationsvorlage enthielt ebenfalls Hydrochinon. Ethylendiamin und Triethyldiamin wurden destillativ gereinigt.

Bei allen anderen hier nicht aufgeführten Reagenzien erübrigte sich eine Reinigung, da die im Handel erhältlichen Reinheitsgrade ausreichend waren.

10.2 Darstellung der Perlcopolymerisate

10.2.1 Beschreibung der Apparatur

Alle Perlcopolymerisationen wurden in einem mit Rückflußkühler versehenen 1-Liter-Flanschkolben mit Vierhalsflanschdeckel (Firma Jenaer Glaswerke Schott & Gen., Mainz) durchgeführt (Abb. 25). Der verwendete Metallflügelrührer war in eine wassergekühlte Stahlschliffhülse eingeschraubt, die außerdem noch einen Glaszufuhrstutzen aufwies. Über eine Kardankupplung war der Rührer mit einem Elektromotor verbunden (Heidolph Motor, Typ RZR III mit stufenlosem Kegelradgetriebe). Die Rührgeschwindigkeit, die sich stufenlos von 30 bis 1800 U/min regeln läßt, wurde mit einem Drehzahlmesser bestimmt. Das Reaktionsgefäß wurde durch ein Wasserbad thermostatisiert.

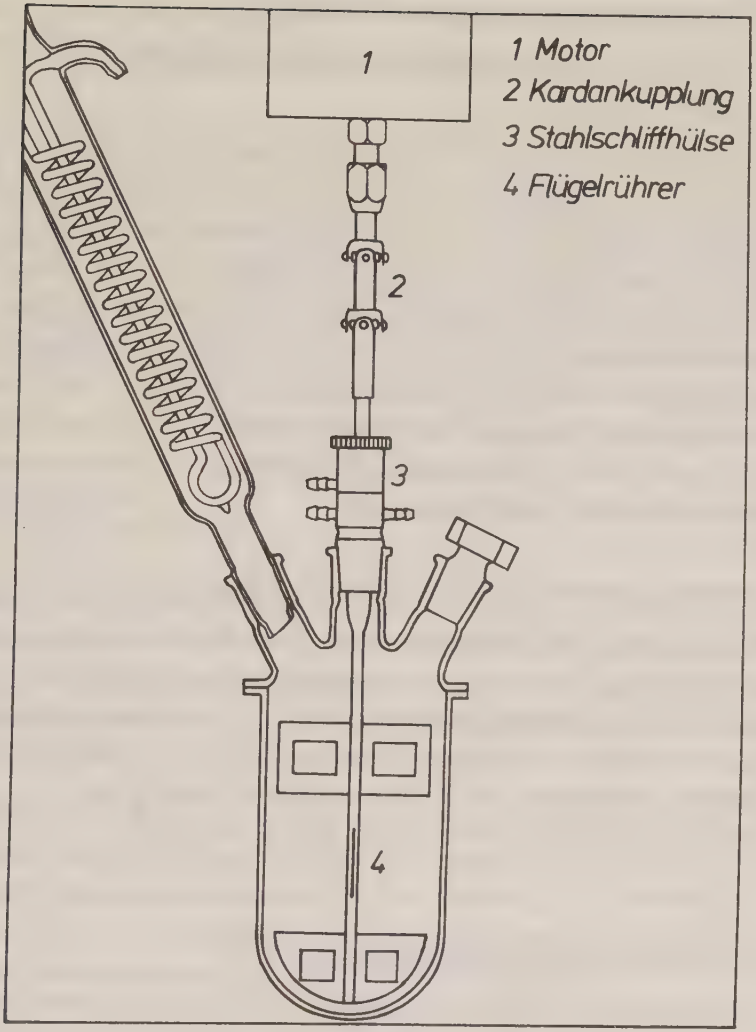


Abb. 25: Aufbau der für die Perlcopolymerisationen verwendeten Apparatur.

10.2.2 Durchführung der Perlcopolymerisationen

a) In Gegenwart von Wasser durchgeführte Perlcopolymerisation (Beispiel: Ansatz 101)

Im Reaktionsgefäß löst man in 400 ml Leichtbenzin (Siedebereich 100-140°C) unter Rühren 2 g PA 18 (Copolymeres aus Maleinsäureanhydrid und Octadecen). Danach wird Stickstoff eingeleitet. Zu der filtrierten Monomerlösung aus 50 g Acrylamid, 12,5 g N,N´-Methylenbisacrylamid *) und 100 ml Wasser wird 0,5 g Ammoniumperoxodisulfat und 2 ml 2n Natronlauge gegeben. Dann gibt man die Monomermischung zu der im Reaktionsgefäß befindlichen klaren Lösung. Die Rührgeschwindigkeit wird auf 380 U/min und die Temperatur auf 40°C eingestellt. Nach Erreichen der vorgewählten Temperatur wird sie 2 h beibehalten. Danach wird noch 2 h auf 50°C erhitzt, um den restlichen Initiator zu zersetzen, und anschließend die Reaktionsmischung in 2 l Aceton eingegossen.

b) Heterogen-vernetzende Perlcopolymerisation (Beispiel: Ansatz 118)

Analog zu der unter a) beschriebenen Perlcopolymerisation wird die Monomerlösung aus 50 g Acrylamid, 12,5 g N,N´-Methylenbisacrylamid, 120 ml Wasser, 80 ml Methanol, 0,5 g Ammoniumperoxodisulfat und 2 ml 2 n Natronlauge in der Lösung von 2 g PA 18 in 400 ml Leichtbenzin (Siedebereich 100-140°C) unter Stickstoffatmosphäre durch Rühren bei 360 U/min dispergiert und polymerisiert.
Die Aufarbeitung der Copolymerisate ist in Kapitel 4 beschrieben.

10.3 Darstellung von N,N´-Ethylenbisacrylamid

N,N´-Ethylenbisacrylamid wurde ausgehend von Acrylsäurechlorid und Ethylendiamin synthetisiert [24]. Eine Mischung aus 15 g Ethylendiamin, 45 ml Triethyldiamin und 75 ml trockenem Benzol läßt man zu einer Lösung aus 45 g Acrylsäurechlorid und 200 ml trockenem Benzol unter Rühren zutropfen, wobei die Temperatur zwischen 0 und 5°C gehalten wird. Nach beendeter Zugabe des Amins wird noch 2 h bei 0 bis 5°C gerührt. Das ausgefallene Produkt, das Triethylaminhydrochlorid enthält, wird abgesaugt. Anschließend wird das N,N´-Diacrylethylendiamin mit Essigsäureethylester aus dem Gemisch extrahiert, bis mit frischem Lösungsmittel

*) Produkt der Firma Aldrich Chemical Corp., Inc., Milwaukee (USA)

keine Substanz mehr herausgelöst wird. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und aus Essigsäureethylester umkristallisiert.

^{1}H-NMR-Spektrum und Schmelzpunktbestimmung zeigten, daß das Produkt noch mit dem Triethylaminhydrochlorid verunreinigt ist. Um das Salz vollkommen zu entfernen, werden die Kristalle in Methanol gelöst und zuerst über einen Kationenaustauscher (Gegenion: H^+) und dann über einen Anionenaustauscher (Gegenion: OH^-) gegeben. Die nach Einengen und Umkristallisation aus Essigsäureethylester erhaltenen Kristalle sind nach dem IR- und dem ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.26 und 27) sowie nach der Elementaranalyse N,N´-Ethylenbisacrylamid.

Ausbeute: 5 g = 11,9 % bezogen auf das eingesetzte Ethylendiamin

Fp.: 98-100°C (Literaturwert [24]: Fp. = 116°C)

Elementaranalyse $C_8H_{18}N_2O_2$ (168 g·mol^{-1})	ber.:	C 57,14 %	H 7,14 %	N 16,67 %
	gef.:	C 57,33 %	H 7,20 %	N 16,73 %

Abbildung 26 zeigt das IR-Spektrum des N,N´-Ethylenbisacrylamids mit den Amid-Banden bei 1640 cm^{-1} und 1545 cm^{-1}, der NH-Valenzschwingung bei 3220 cm^{-1}, der C=C-Doppelbindung-Valenzschwingung bei 1610 cm^{-1} und den CH_2=CH-Valenzschwingungen bei 3050 cm^{-1} sowie deren Deformationsschwingungen bei 945 und 970 cm^{-1}.

Abbildung 27 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum des N,Nß-Ethylenbisacrylamids. Das Spektrum wurde in Trifluoressigsäure aufgenommen, da die Löslichkeit in anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln klein ist. Die Methylenprotonen erscheinen bei 3,4 ppm, die zur Carbonylgruppe benachbarten olefinischen Protonen bei 6,0 ppm und die Amidprotonen bei 7,8 ppm im Verhältnis 4 : 2 : 4 : 2.

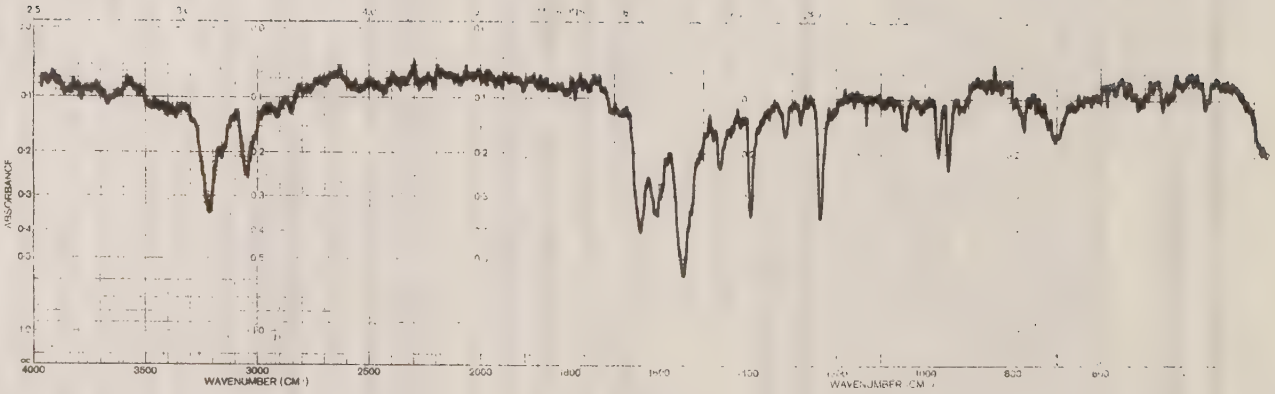


Abb.26:

IR-Spektrum von N,N´-Ethylenbisacrylamid, KBr-Preßling "Medium" (aufgenommen an einem Perkin-Elmer 457 Infrarot-Spektrophotometer).

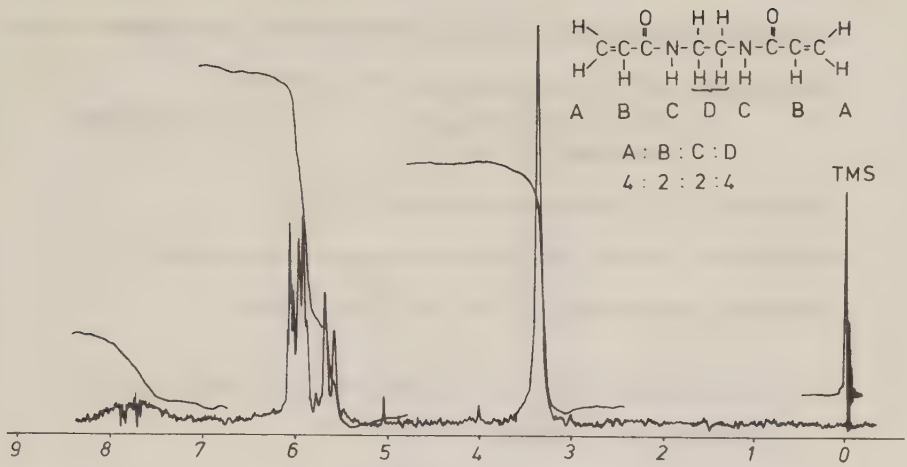


Abb. 27:
^{1}H-NMR-Spektrum von N,N´-Ethylenbisacrylamid in Trifluoressigsäure (aufgenommen an einem Varian T 60-Gerät).

10.4 Modifizierung des Schutzkolloids durch polymeranaloge Umsetzung

a) Veresterung von Octadecen-maleinsäureanhydrid-copolymerisat mit Diethylenglykolmonomethylether zum Halbester (siehe Kap. 7.5)

15 g des Schutzkolloids (PA 18) wurden mit einem Überschuß an Diethylenglykolmonoethylether (150 ml) 2 Tage zum Sieden erhitzt. Der entstandene Ester wurde in Methanol ausgefällt, das Lösungsmittel abrotiert, in Benzol gelöst und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Produkt gefriergetrocknet.

Die Ausbeute betrug 9,6 g = 49 % bezogen auf das eingesetzte Schutzkolloid. Zur quantitativen Bestimmung der Carboxylgruppen wurde der Ester in THF gelöst, ein Überschuß methanolische KOH (ca. 0,1 n) dazugegeben und sofort in der Kälte mit 0,1 n HCl zurücktitriert.

COOH berechnet: 2,18 mmol/g
COOH gefunden: 2,26 mmol/g.

Abbildung 28 zeigt das IR-Spektrum des Halbesters mit den erwarteten Banden:

Säuregruppe: OH-Valenzschwingung bei 2500 - 3600 cm^{-1}
CO-Valenzschwingung bei ca. 1720 cm^{-1}, Deformationsschwingung bei 920 cm^{-1}

Estergruppe: CO-Valenzschwingung bei ca. 1720 cm^{-1}

Ethergruppe: C-O-C- breite Bande zwischen 1000 und 1200 cm^{-1} .

Die Banden der Anhydridgruppe sind nicht mehr zu sehen.

b) Veresterung von Octadecen-maleinsäureanhydrid-copolymerisat mit Cetylalkohol zum Halbester (siehe Kap. 7.5)

7,5 g PA 18 wurden mit einem Überschuß an Cetylalkohol (75 ml) in 100 ml Xylol 2 Tage zum Sieden erhitzt. Der Ester wurde in Aceton ausgefällt, das Aceton abrotiert und das Produkt in Benzol gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 9,7 g = 76,5 % bezogen auf das eingesetzte Schutzkolloid. Der Carboxylgruppengehalt des Esters wurde wie oben beschrieben bestimmt.

COOH berechnet: 2,18 mmol/g
COOH gefunden: 2,16 mmol/g

Abbildung 29 zeigt das IR-Spektrum des Halbesters mit den erwarteten Banden der Carboxyl- und Estergruppe; die Banden der Anhydridgruppe sind verschwunden (siehe auch Abb. 28).

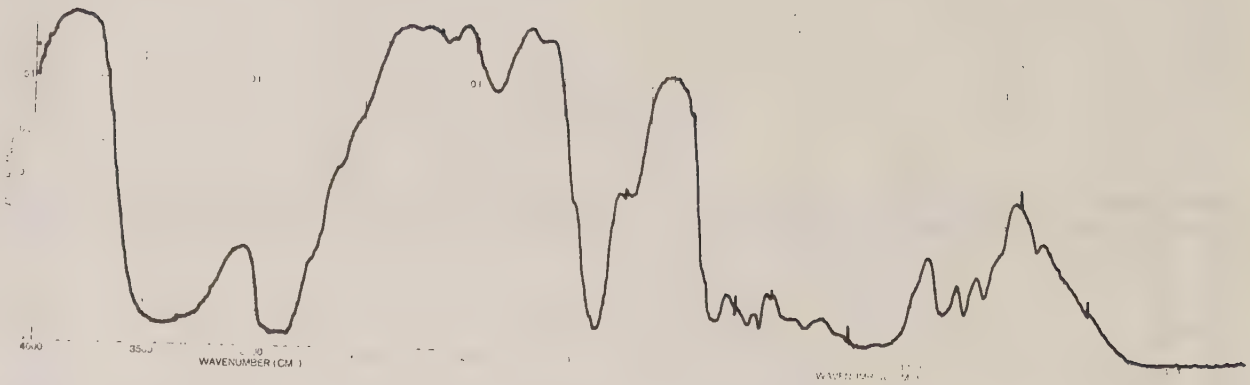
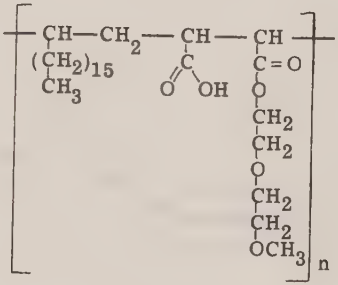


Abb. 28: IR-Spektrum von  , Film, "Medium" (aufgenommen an einem Perkin-Elmer 457 Infrarot-Spektrophotometer).

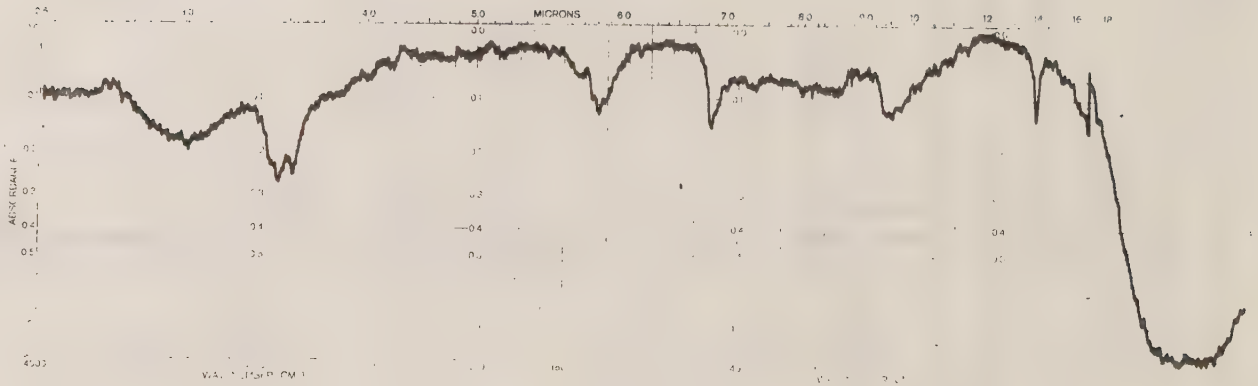
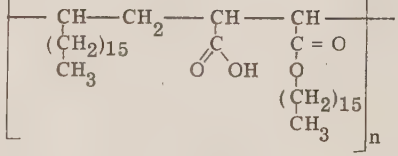


Abb. 29: IR-Spektrum von  , Film, "Medium" (aufgenommen an einem Perkin-Elmer 457 Infrarot-Spektrophotometer).

10.5 Versuchsanordnung für die gelchromatographischen Trennungen

Abbildung 30 zeigt das Schema der gelchromatographischen Versuchsanordnung, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Aus dem Vorratsgefäß 1 fließt über einen Entgaser 2 Lösungsmittel (Wasser) durch die Referenzzelle des Differentialrefraktometers *) 3 zur Pumpe**) 4 , an die auf der Druckseite ein Manometer angeschlossen ist. Von dort gelangt das Wasser über eine Einspritzvorrichtung***) 5 zur Säule 6 . Zur Erzielung guter Trennergebnisse können mehrere Säulen hintereinander geschaltet werden, wobei man das Gelmaterial und die Säulenzahl dem Trennproblem anpaßt. Die Konzentration der zu trennenden Substanz im Eluat wird am Säulenausgang in der Meßzelle des Differentialrefraktometers 7 gemessen und auf einem Schreiber registriert. Zur Bestimmung des Elutionsvolumens dient ein Heber, der der Meßzelle nachgeschaltet ist. Jede Entleerung des Hebers wird durch die optische Abtastung 8 registriert und erscheint als Markierung auf dem Schreiber. Außer einem Differentialrefraktometer können auch UV- und IR-Geräte als Anzeigeinstrumente benutzt werden.

Die Gelchromatographiesäulen bestehen aus Glasrohren (90 x 1,43 cm der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; 100 x 1,5 cm der Firma Schott, Mainz).
Zum Füllen der Trennsäule gießt man die nach Kapitel 4.1 bereitete Gelsuspension in eine unten verschlossene und mit einem aufgeschraubten Füllstück versehene Glassäule. Sobald ein Teil des Gels sich abgesetzt hat, läßt man das Lösungsmittel frei durchfließen. Es bilden sich dabei drei Schichten aus: das eigentliche Gelbett, die Gelsuspension und das klare Lösungsmittel. Hat das Gel sich nach ca. 5 bis 12 h vollständig gesetzt, wird die Pumpe angeschlossen und die Pumpgeschwindigkeit so einreguliert, daß ein Druck von ca. 2 bar auf dem Gelbett lastet. Wenn die Gelbetthöhe sich nicht mehr ändert, wird das Füllstück mit dem restlichen Gel abgenommen, die Trennsäule verschlossen und wieder an die Pumpe angeschlossen.

---

*) Modell R 4 der Firma Waters Ass., Framingham, Mass.(USA)
**) Feindosierpumpe LDP 13A der Firma Labotron Meßtechnik, Geretsried
***) Mehrwege-Ventil der Firma Labotron Meßtechnik, Geretsried.

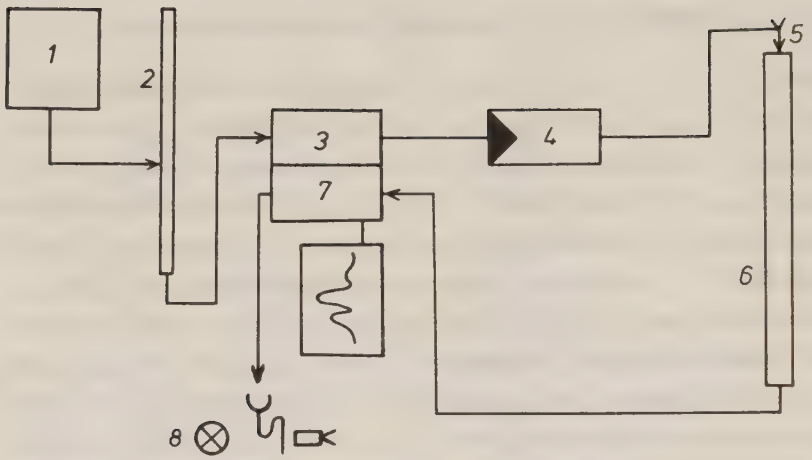


Abb.30: Schematischer Aufbau der gelchromatographischen Apparatur.

1 Vorratsgefäß
2 Entgaser
3 Referenzzelle des Refraktometers
4 Pumpe
5 Einspritzvorrichtung
6 Gelchromatographische Säule
7 Meßzelle des Refraktometers
8 Volumenmessung

Die Durchflußmenge wird so eingestellt, daß der auf dem Gelbett lastende Druck ca. 1 bis 1,5 bar beträgt. Die verschlossene Trennsäule wird solange mit Wasser eluiert, bis die Basislinie des Schreibers konstant ist. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (23°C) ausgeführt.

Tabelle 15:

Zusammenstellung der in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgele und ihre Eigenschaften.

Spalte (1): Ansatz Nr.

Spalte (2): Polymerisationsbedingungen

M: Monomermischung
A = Acrylamid
Bis A = N,N´-Methylenbisacrylamid
Gly = Glyoxalbisacrylamid *)
PT: Polymerisationstemperatur (^{o}C)
PZ: Polymerisationszeit (h)
R: Rührgeschwindigkeit (U/min)
I: Initiator
APD = Ammoniumperoxodisulfat
P = Präpolymeres auf der Basis von Acrylamid initiiert mit einem Polyinitiator (AIBN-Tetraethylenglykolester)

Spalte (3): Eigenschaften der Perlpolymeren

V_{sch} = spezifisches Schüttvolumen (ml/g)
V_G = spezifisches Gelbettvolumen in Wasser bei 23^{o}C (ml/g)
M_{lim} = Ausschlußmolekulargewicht

Spalte (4): Partikelgröße (μ)

Spalte (5): Bemerkungen.

*) Produkt der Firma Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt/M.

(1)	(2)					(3)			(4)	(5)
	M	PT	PZ	R	I	V_{sch}	V_G	M_{lim}		
101	50 g A + 12,5 g BisA + 100 ml H_2O	60	3	380	APD	1,25	3,45	800	25-160	klare, feste, runde Perlen
102	50 g A + 12,5 g BisA + 100 ml H_2O	65	2	450	APD	1,20	4,00	—	12-70	klare, feste, runde Perlen
104	50 g A + 12,5 g BisA + 100 ml H_2O + 5 g NaCl	50	4	420	APD	1,45	3,50	1100	40-200	klare, feste, runde Perlen
105	50 g A + 12,5 g BisA + 100 ml H_2O + 10 g NaCl	50	4	430	APD	1,50	4,05	1200	10-120	klare, feste, runde Perlen
121	50 g A + 20 g BisA + 200 ml H_2O	40	3	350	APD	1,65	7,50	—	50-400	trübe, verklebte, runde Perlen
122	50 g A + 21,5 g BisA + 200 ml H_2O	40	4	350	APD	1,65	7,35	—	40-680	trübe, verklebte, runde Perlen
123	50 g A + 26,9 g BisA + 200 ml H_2O	40	4	360	APD	1,40	6,50	—	25-200	trübe, feste, klebrige Perlen
126	50 g A + 12,5 g BisA + 100 ml H_2O	70 80	5 2	380	P	1,40	6,25	3000	20-240	klare, verklebte, runde Perlen
138	50 g A + 12,5 g Gly + 150 ml H_2O	25 40 50	2 3 2	380	APD	1,50	4,00	1500	20-150	klare, feste, runde Perlen

Tabelle 16:

Zusammenstellung der heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele.

Spalte (1): Ansatz Nr.

Spalte (2): Verwendete Inertkomponente (ml)
Me-H_2O = Methanol-Wasser
n-Pr-H_2O = n-Propanol-Wasser
DMSO-H_2O = Dimethylsulfoxid-Wasser

Spalte (3): Polymerisationsbedingungen
Co-M = Comonomere
A = Acrylamid (g)
BisA = N,N´-Methylenbisacrylamid (g)
Gly = Glyoxalbisacrylamid (g)
EBisA = N,N´-Ethylenbisacrylamid (g)
S = Schutzkolloid
PA 18 = Copolymer aus Maleinsäureanhydrid und Octadecen bis zur Hälfte in das Natriumsalz überführt (g)
E_1PA 18 = Halbester des PA 18 mit Diethylenglykolmonomethylether (g)
E_2PA 18 = Halbester des PA 18 mit Cetylalkohol (g)
S-PA 18 = Natriumsalz des PA 18 (g)
R = Rührgeschwindigkeit (U/min)
I = Initiator
APD = Ammoniumperoxodisulfat
P = Präpolymer auf der Basis von Acrylamid initiiert mit einem Polyinitiator (AIBN-Tetraethylenglykolester)

Eigenschaften der Polyacrylamidgele:

Spalte (4): V_{sch} = spezifisches Schüttvolumen (ml/g)

Spalte (5): V_G = spezifisches Gelbettvolumen in Wasser bei 23°C (ml/g)

Spalte (6): M_{lim} = Ausschlußmolekulargewicht

Spalte (7): Aussehen der Polymerpartikel
K = klar, durchsichtig
T = trüb, durchscheinend
W = weiß, undurchsichtig

Spalte (8): Form und Zustand der Polymerpartikel
R = rund, kugelförmig
U = unregelmäßig geformt
AG = Agglomerate der Polymerpartikel.

(1)	(2)	(3) Co-M	S	R	I	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
106	20-80 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	430	APD	1,40	3,00	800	K	R
107	40-60 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	416	APD	1,50	3,50	—	K	R
108	40-60 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	430	APD	1,50	3,00	750	K	R
109	120-80 Me-H_2O	100A + 25 BisA	4 PA 18	440	APD	3,00	6,00	—	T	R,AG
110	120-80 Me-H_2O	100A + 25 BisA	4 PA 18	300	APD	1,40	4,30	1000	T	R,AG
111	70-30 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	320	APD	1,60	4,00	1500	T	R,AG
112	120-30 Me-H_2O	75 A + 18,75 BisA	3 PA 18	320	APD	—	—	—	T	U,AG
113	120-30 Me-H_2O	75 A + 18,75 BisA	6 PA 18	320	APD	—	—	—	T	U,AG
114	80-20 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	3 PA 18	340	APD	—	—	—	T	U,AG
116	60-90 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	320	APD	1,35	6,60	80000	T	R,AG
117	50-100 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	340	APD	1,50	6,45	10000	T	R,AG
118	80-120 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	360	APD	1,90	8,25	$2 \cdot 10^6$	T	R,AG
119	100-150 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	4 PA 18	310	APD	1,60	9,70	10^6	T	R,AG
124	70-80 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	350	APD	1,55	6,55	100000	W	R,AG
125	90-60 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	350	APD	2,20	10.25	—	W	U,AG

(1)	(2)	(3) Co-M	S	R	I	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
127	60-90 n-Pr-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	400	APD	1,60	5,30	250000	W	R, AG
128	90-60 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	410	APD	1,70	6,20	500000	W	R, AG
129	70-80 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 E_1 PA 18	410	APD	—	—	—	T	U, AG
130	100-150 n-Pr-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	360	P	—	12,3	—	T	R
131	100-100 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	4 PA 18	380	APD	1,60	7,80	$2 \cdot 10^6$	T	R
132	70-80 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	380	APD	1,45	7,10	100000	T	R, AG
133	50-100 Me-H_2O	50 A + 12,5 Gly	2 PA 18	380	APD	1,50	4,45	2500	K	R
134	70-80 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 E_2 PA 18	380	APD	—	—	—	T	U, AG
135	50-150 Me-H_2O	50 A + 15 Gly	4 PA 18	380	APD	1,40	5,00	3000	K	R
136	50-100 Me-H_2O	50 A + 10 Gly	4 PA 18	380	APD	1,50	4,70	1500	K	R
137	120-130 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	4 PA 18	380	APD	1,50	8,80	40000	T	R
140	80-120 Me-H_2O	50 A + 40 Gly	4 PA 18	370	APD	1,60	3,00	1500	K	R
141	80-120 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	4 PA 18	500	APD	1,70	6,75	20000	T	R
142	70-97 Me-H_2O	50 A + 5,6 BisA	4 PA 18	400	APD	1,40	7,80	5000	K	R
143	120-80 DMSO-H_2O	50 A + 12,5 Gly	4 PA 18	400	APD	—	—	—	T	U, AG
144	80-120 Me-H_2O	53,12 A + 9,38 BisA	4 PA 18	400	APD	1,70	7,40	6000	T	R

(1)	(2)	(3) Co-M	S	R	I	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
145	40-60 Me-H_2O	16 A + 4 EBisA	2 PA 18	400	APD	1,90	10,90	6000	K	R
146	80-120 Me-H_2O	50 A + 16,7 BisA	4 PA 18	370	APD	1,45	7,30	250000	W	R, AG
147	80-120 Me-H_2O	50 A + 24,1 BisA	4 PA 18	380	APD	2,00	6,00	10^6	W	R, AG
148	98-107 Me-H_2O	50 A + 27 BisA	4 PA 18	380	APD	2,50	6,00	500000	W	R, AG
149	80-120 Me-H_2O	50 A + 12,5 BisA	2 PA 18	350	APD	2,20	7,60	300000	W	R, AG
150	160-240 Me-H_2O	100 A + 25 BisA	4 PA 18	500	APD	1,90	8,25	30000	W	R, AG
151	160-240 Me-H_2O	100 A + 25 BisA	4 PA 18	500	APD	1,90	8,25	$2 \cdot 10^6$	T	R, AG

11. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines hydrophilen druck- und biostabilen Gels, das als stationäre Phase für die Gelchromatographie Verwendung finden kann.

(1) Durch Perlpolymerisation wurden Copolymere aus Acrylamid und einer vernetzenden Vinylkomponente mit unterschiedlicher Netzwerkstruktur hergestellt. Der größte Teil des Copolymerisates bestand aus Perlen der Größe 0,03 bis 0.2 mm .

(2) Quellungsversuche und gelchromatographische Untersuchungen an einem mit 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid in Gegenwart von Wasser hergestellten Polyacrylamidgel zeigten, daß Polyacrylamid als hydrophile stationäre Phase zu verwenden ist. Das Gel eignet sich gut zur Trennung hydrophiler Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 1200 .

(3) Bei den in Gegenwart von Wasser hergestellten Gelen wurde die Konzentration der Vernetzungskomponente im Monomerengemisch von 20 bis 35 Gew.-% variiert. Bei Gelen mit Vernetzerkonzentrationen höher als 20 Gew.-% folgt die Vernetzung nicht mehr gleichmäßig; die Gele besitzen eine sehr hohe Ausschlußgrenze und weisen eine bimodale Porengrößenverteilung auf.

(4) Als Inertkomponente für die heterogen-vernetzende Copolymerisation des Acrylamids diente ein Verdünnungsmittelgemisch aus Fällungs- und Lösungsmittel. Die verwendeten Fällungsmittel waren Methanol, n-Propanol und Dimethylsulfoxid. Ihr Volumenanteil in der Inertkomponente wurde von 0 bis 0,8 variiert. Als Lösungsmittel wurde stets Wasser eingesetzt. Die Konzentration des Verdünnungsmittelgemisches betrug zwischen 57 und 79 Gew.-% der Monomerphase.
Methanol und n-Propanol sind als Verdünnungsmittel bei der Copolymerisation gut geeignet, während mit Dimethylsulfoxid keine Perlen erhalten werden.

(5) Bei einer Konzentration des Verdünnungsmittelgemisches von 74,6 Gew.-% der Monomerphase, mit einem Volumenanteil an Methanol von 0,4 und einem Vernetzergehalt von 20 Gew.-% N,N´-Methylenbisacrylamid sind die erhaltenen heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele permanent porös und besitzen ein Ausschlußmolekulargewicht in der Größenordnung von $2 \cdot 10^6$.

(6) Das Ausschlußmolekulargewicht heterogen-vernetzter Polyacrylamidgele kann bei konstanter Verdünnungsmittelkonzentration und gleichbleibender Zusammensetzung des Verdünnungsmittelgemisches durch Veränderung der Vernetzerkonzentration im Bereich von 5000 bis $2 \cdot 10^6$ variiert werden.

(7) An zwei Polyacrylamidgelen, die ein mit Polyethylenglykolen und Dextranen bestimmtes Ausschlußmolekulargewicht von 300000 und $1 \cdot 10^6$ besitzen, wurden Proteine getrennt. Die Abhängigkeit der Elutionsvolumina vom Logarithmus der Molekulargewichts ist in weiten Grenzen linear. Die Elutionsvolumina aller getesteten Proteine liegen auf der gleichen Eichkurve. Störende Absorptionen wurden nicht beobachtet. Molekulargewichtsbestimmungen unbekannter Proteine sind daher möglich. Mikrobenbefall und Verringerung der Durchflußgeschwindigkeit war während eines mehrwöchigen Betriebes nicht festzustellen.

(8) Die homogen- und heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele besitzen eine ausreichende mechanische Stabilität; sie eignen sich gut zur gelchromatographischen Trennung hydrophiler Substanzen und sind gut reproduzierbar herzustellen.

(9) In wäßrigen Lösungen mit verschiedenen Elektrolytgehalten zeigen die heterogen-vernetzten Polyacrylamidgele im Gegensatz zu handelsüblichen Bio-Gelen keine Änderung im Quellungsgrad.

(10) Die Verwendung von Glyoxalbisacrylamid als Vernetzer führt zu Polyacrylamidgelen, deren Ausschlußmolekulargewicht nicht höher als 3000 liegt.
Als neuer Vernetzer wurde N,N´-Ethylenbisacrylamid synthetisiert. Das Ausschlußmolekulargewicht eines damit vernetzten Perlcopolymerisats lag bei ca. 6000 .

12. Literaturverzeichnis

1) Porath, J., Flodin, P., Nature, London 183, 1657 (1959)

2) Hjerten, S., Biochim. Biophys. Acta 79, 393 (1964)

3) Lea, D.J., Sehon, A.H., Canad. J. Chem. 40, 159 (1962)

4) Determann, H., Gelchromatographie, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967)

5) Determann, H., Lüben, G., Wieland, H., Makromol.Chem. 73, 168 (1964)

6) Moore, J.C., J.Polymer Sci. A2, 835 (1964)

7) Heitz, W., Platt, K.L., Makromol.Chem. 127, 113 (1969)

8) Heitz, W., Börner, B., Ullner,H., Makromol.Chem. 121, 102 (1969)

9) Hjerten, S., Mosbach, R., Anal.Biochem. 3, 109 (1962)

10) Hjerten, S., Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 147 (1962)

11) Sun, K., Sehon, A.H., Canad. J. Chem. 43, 969 (1965)

12) Heitz, W., Platt, K.L., Ullner, H., Wilnau, H., Makromol.Chem. 102, 63 (1967)

13) Heitz, W., Ber.Bunsenges. Phys. Chem. 77, 210 (1973)

14) Lutz, E., Dissertation Eidgenössische Hochschule, Zürich 1957, Prom.-Nr. 2749

15) Hopff, H., Lüssi, H., Gerspacher, P., Makromol.Chem. 78, 24 (1964)

16) Heitz, W., Coupek, J., Makromol.Chem. 105, 280 (1967)

17) Fawcett, J.S., Morris, C.J.O.R., Separation Sci. 1, 9 (1958)

18) Ogston, A.G., Trans. F raday Soc. 54, 1754 (1958)

19) Seidl, J., Malinsky, J., Dusek, K., Heitz, W., Adv.Polymer Sci. 5, 113 (1967)

20) Dusek, K., J.Polym.Sci. B3, 209 (1965)

21) Acuff, Dale R., Jackson, L., Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift Nr. 1900517 (1969)

22) Flory, P.J., Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, New York (1953)

23) Brandrup, J., Immergut, E.H., Polymer Handbook, Intersci. Publ., New York (1965)

24) Danuso, F., Ferruti, P., Ferroni, G., Chimica e Industria 49, 271 (1967)

25) Danuso, F., Ferruti, P., Ferroni, G., Chimica e Insutria 49, 453 (1967)

26) Walz, R., Dissertation, Mainz (1975)

27) Deininger, G., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 77, 148 (1973)

28) Platt, K.L., Dissertation, Mainz (1968).

Die vorliegende Arbeit wurde am Fachbereich Physikalische Chemie, Bereich Polymere, der Philipps-Universität Marburg/Lahn im Oktober 1976 begonnen und im Januar 1979 abgeschlossen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W.Heitz, danke ich für die Überlassung des Themas, für das stete Interesse an der Arbeit und seine wertvollen Anregungen in wissenschaftlichen Diskussionen.

Ebenso danke ich den Kollegen des Arbeitskreises für ihre ständige Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Diskussionen. Mein Dank gilt insbesondere meinem lieben Kollegen W. Krappitz.

Für die Anfertigung der vielen Abbildungen sei Frau I. Hass gedankt.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die Überlassung eines Stipendiums.

Lebenslauf

Am 4. August 1950 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Carlos Bilbao und seiner Ehefrau Margarita geb. Sáez in Concepción (Chile) geboren. Von 1957 bis 1968 besuchte ich das Colegio Inmaculada Concepción und begann im März 1969 das Biochemie-Studium an der Universidad de Concepción, das ich im Februar 1974 beendete. Meine Diplomarbeit fertigte ich bei Prof. Dr. B.Seeger am Fachbereich Chemie der Universidad de Concepción an. Dabei befaßte ich mich mit der Darstellung von Polyacrylamid mit Trioxalatomanganat (III) als Initiator. Im Juni 1976 kam ich nach Deutschland, nahm an einem Sprachkurs am Goethe-Institut (Blaubeuren) teil und begann im Oktober desselben Jahres die Arbeiten für die vorliegende Dissertation am Fachbereich Physikalische Chemie, Bereich Polymere, an der Philipps-Universität Marburg/Lahn.